

**Lehtopalsamin (*Impatiens noli-tangere*) populaatiogenetiikka
levinneisyysalueen reunamilla**

Stiina Lehmus

Pro gradu -tutkielma

Oulun yliopisto

Biologian tutkinto-ohjelma

kesäkuu 2019

Sisällysluettelo

1	Johdanto	1
1.1	Reuna- ja keskuspopulaatiot.....	1
1.2	Lehtopalsami.....	2
1.2.1	Levinneisyys ja kasvupaikat.....	2
1.2.2	Lisääntyminen	5
1.3	Populaatiogenetiikka	8
1.3.1	Mikrosatelliitit.....	8
1.3.2	Epäsatunnainen parituminen	8
1.3.3	Hardy-Weinberg -tasapaino.....	9
1.3.4	Geneettinen monimuotoisuus	9
1.3.5	Efektiivinen populaatiokoko	10
1.3.6	Populaation pullonkaula	10
1.3.7	Populaatorakenne.....	11
1.3.8	Geenivirta.....	11
1.4	Hypoteesit ja työn tarkoitus.....	12
2	Aineisto ja menetelmät.....	14
2.1	Tutkimuspopulaatiot.....	14
2.1.1	Hietasaari	15
2.1.2	Hämyhete.....	16
2.1.3	Harjavalta	18
2.1.4	Hanganhete.....	19
2.1.5	Karjasilta.....	20
2.1.6	Kasvipuutarha	21
2.1.7	Pohjantie	21
2.1.8	Pyykösjärvi	21

2.1.9	Sauvojantie.....	22
2.1.10	Toppila.....	23
2.1.11	Välivainio.....	24
2.1.12	Vengas.....	24
2.2	Näytteenotto.....	25
2.3	DNA:n eristys.....	26
2.4	Mikrosatelliitit.....	27
2.5	PCR.....	29
2.6	Agaroosielektroforeesi.....	29
2.7	Alleelikokojen määrittäminen.....	29
2.8	Analysointi.....	29
2.8.1	KytKentäepäTasapaino, Hardy-Weinberg -tasapaino ja nolla-alleelit	29
2.8.2	Geneettinen monimuotoisuus ja F_{IS}	30
2.8.3	Geenivirta.....	30
2.8.4	Populaatorakenne.....	31
2.8.5	Efektiivinen populaatiokoko	32
2.8.6	Populaation pullonkaula	32
3	Tulokset.....	33
3.1	DNA:n eristyminen ja monistuminen.....	33
3.2	KytKentäepäTasapaino, Hardy-Weinberg -tasapaino ja nolla-alleelit	35
3.3	Geneettinen muuntelu	35
3.4	Geenivirta.....	38
3.5	Populaatorakenne.....	39
3.6	Efektiivinen populaatiokoko	42
3.7	Populaation pullonkaula	43
4	Pohdinta.....	46
4.1	Monimuotoisuus, F_{IS} ja efektiivinen populaatiokoko	46
4.2	Populaation pullonkaula	48

4.3	Populaatiorakenne ja geenivirta	49
4.4	Keskus- ja reunapopulaatiot	50
4.5	Aineiston luotettavuus.....	51
4.6	Ehdotuksia jatkotutkimukseen	52
4.7	Lajin tulevaisuus alueella	52
5	Yhteenveto.....	54
6	Kiitokset	56
7	Viitteet	57

1 Johdanto

1.1 Reuna- ja keskuspopulaatiot

Maantieteellisen levinneisyytensä äärirajoilla esiintyvät eliöpopulaatiot ovat kiinnostavia luonnonsuojelubiologisen tutkimuksen kannalta. Näitä populaatioita voidaan kutsua marginaalisiksi tai perifeerisiksi populaatioiksi. Termeillä on pieniä eroja, mutta usein perifeeriset populaatiot ovat myös marginaalisia, toki eivät aina. Perifeerinen populaatio liittyy vahvasti maantieteelliseen sijaintiin. Tällainen populaatio on kaukana lajin levinneisyysalueen keskusalueilta. Marginaalinen populaatio taas kertoo enemmän ekologisesti lajin selviytymisalueen reunalla olost (Channell, 2004). Käytän tässä työssä termejä reuna- ja keskuspopulaatio kuvaamaan populaatioiden sijoittumista suhteessa lajin maantieteelliseen ja ekologiseen levinneisyysalueeseen.

Populaatioiden oletetaan olevan sitä suurempia ja sitä tiheämmässä mitä lähempänä ollaan lajin levinneisyysalueen keskipistettä (abundant centre hypothesis). Hypoteesiin sisältyy oletus, että lajin geneettinen monimuotoisuus ja demografinen kapasiteetti heikkenevät keskeiseltä levinneisyysalueelta reunoja kohti (Pironon ym., 2017). Hypoteesi kuitenkin aliarvioi maantieteellisen vaihtelun lajin esiintyvyydessä ja genetiikassa, eikä pelkkä etäisyys lajin esiintymisen keskipisteestä välttämättä olekaan hyvä yleistys (McMinn ym., 2017). Etäisyyksien lisäksi geneettistä ja demografista variaatiota muokkaavat ekologiset ja historialliset gradientit (Pironon ym., 2017). Keskuspopulaatioista reunapopulaatioihin siirryttäessä on kuitenkin havaittu populaatioiden välisen erilaistumisen kasvavan ja populaatioiden sisäinen monimuotoisuuden pienenevän. Erot ovat usein pieniä eikä niiden syistä ole selkeyttä (Eckert ym., 2008).

Reunapopulaatiot ovat siis usein erilaistuneita keskipopulaatioihin nähden. Niillä vallitsevat erilaiset ja kenties kovemmat valintapaineet ja olosuhteet, geenivirta muiden populaatioiden kanssa voi olla tyrehtynyt tai hyvin vähäistä ja populaation historian pullonkaulavaiheet perustajavaikutuksineen ovat antaneet oman leimansa populaatioille. Marginaalipopulaatiot ovat täten usein kokoonsa nähden epäsuhtaisen tärkeitä ja niitä pidetään lajiutumiseen arvokkaina (Lesica & Allendorf, 1995). Toisaalta pienet reunapopulaatiot ovat alttiimpia geneettiselle ajautumiselle, eivätkä ne välttämättä pysty ylläpitämään lajiutumiseen tai uusien alueiden valtaamiseen - saatikka pidempiaikaiseen selviytymiseen - tarvittavaa geneettistä monimuotoisuutta (Eckert ym., 2008).

Viimeisimmän jääkauden jälkeen lajin levittäytyminen jään alta paljastuneille alueille on ollut nopeaa kolonisaatioketjua - pullonkaulaa pullonkaulan perään. Tässä rytkäksä lajit ovat

menettäneet alleeleja ja heterotsygotiaa (Hewitt, 2004). Korkeammilla leveysasteilla jäätiköitymisen on havaittu muuttaneen lajien geneettistä muuntelua. Voi olla vaikea erottaa lajien historiallisten levinneisyyksien ja nykyisen evoluution merkitys geneettisen muuntelun maantieteellisessä vaihtelussa (Eckert ym., 2008). Joillain kasvilajeilla on oletettu olleen refuugioita lähellä jääpeitteen reunaa ja niiden selvinneen siten kolonisaatiosta vähemmin vaurioin ja geneettisesti monimuotoisempana kuin kauempaa tulleet lajit. Moni laji on myös säilyttänyt korkean monimuotoisuuden monen leviämisreitin johdosta. Moni eläin on tullut Suomeen sekä idästä että lännestä (Hewitt, 2004). Kasveilla on havaittu samaa, esimerkiksi lapinkämmekän (*Dactylorhiza lapponica*) tiedetään tulleen Fennoskandiaan lännestä, todennäköisesti Tanskan kautta ja idästä Suomen ja Viron läpi (Nordström & Hedrén, 2008).

Suuri osa maailmanlaajuisesta suojelupanostuksesta on keskitetty laajalla levinneisyysalueella esiintyvien elinvoimaisten lajien reunapopulaatioihin. Usein taustalla on poliittisia rajoja. Reunapopulaatioiden suojelu on perusteltua silloin, kun niillä on tarpeeksi geneettistä materiaalia muuttua ja kehittyä keskuspopulaatioista poikkeavien olojen myötä (Lesica & Allendorf, 1995). Reunapopulaatioiden on jopa havaittu säilyvän keskuspopulaatioita paremmin pitkällä aikavälillä ympäristön muuttuessa. Historiallisen levinneisyyden reunalla olevat populaatiot ovat viimeisiä muutoksenkin tiellä, kenties jo matkalla muutoksen ajamaan suuntaan (Channell, 2004). Suojelukysymyksiä päätettäessä tulee huomioon ottaa populaation ekologinen, demografinen ja geneettinen arvo sijainnin lisäksi (Pironon ym., 2017).

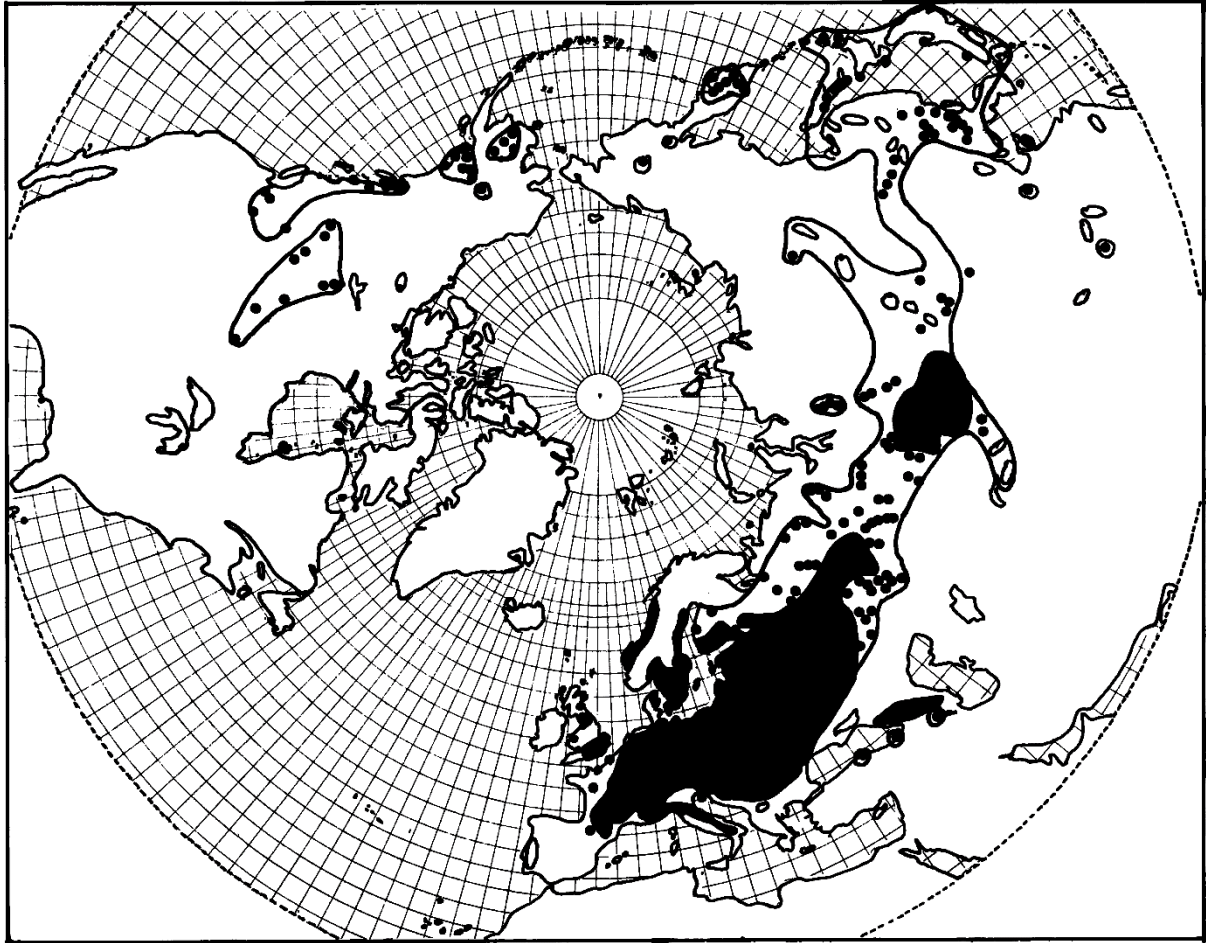
1.2 Lehtopalsami

Lehtopalsami (*Impatiens noli-tangere*) on yksivuotinen ainoastaan siemenistä lisääntyvä ja vain siemeninä talvehtiva (terofyytti) kasvi. Se voi olla nivelikkäältä varreltaan olosuhteista riippuen 20-180 cm pitkä, haarainen tai haaraton. Kasvin varsi ja harvaan tylppähampaiset lehdet ovat miellyttävän vaaleanvihreitä. Jättipalsamin (*I. glandulifera*) tavoin lehtopalsamin juuret ovat lyhyet ja koko kasvi on helppo nykäistä maasta irti. Lehtopalsamin kukat ovat suuria, hyönteispölytteisiä ja keltaisia, taikka umpipölytteisiä kääpiökukkia. Yksilöiden fenotyyppi vaihtelee pienestä haarattomasta umpikukkaisesta suureen ja haaroittuneeseen iso- ja monikukkaiseen. Suuret populaatiokoon vaihtelut ovat lajille tyypillisiä (Hatcher, 2003).

1.2.1 Levinneisyys ja kasvupaikat

Lehtopalsamia kuvaillaan euraasialaiseksi lauhkean vyöhykkeen kasviksi. Se esiintyy ympäri pohjoisen pallonpuoliskon painottuen keskiseen Eurooppaan (kuva 1). Maailmalla lajia esiintyy kosteilla ja märillä - jopa vedenkylästämillä - alustoilla kosteissa metsissä ja vesistöjen varsilla. Laji on typensuosija ja esiintyy yleensä osittaisessa varjossa. Maa saa olla emäksinen, humus- ja

typpirikas, mutta happamalla maalla lehtopalsamia esiintyy harvoin (Hatcher, 2003). Suomessa lehtopalsami tunnetaan puronvarsilehdoista, louhikoista, rehevistä korvista ja lähteiköistä (Hämet-Ahti ym., 1998).



Kuva 1 - Lehtopalsamin levinneisyys (Hatcher 2003)

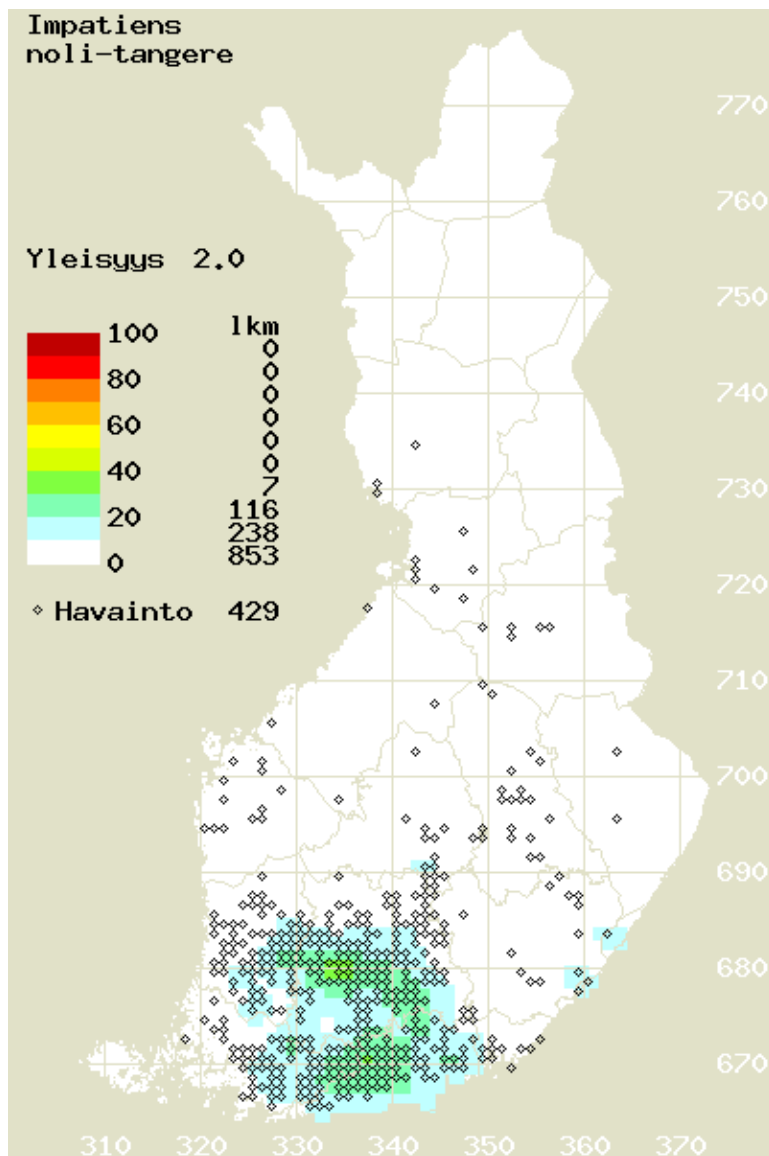
Lehtopalsami on aikaisen sukkession laji ja huono kilpailija. Varttuneissa metsissä se säilyy ainoastaan erilaisten häiriöiden avulla, tällaisia ovat esimerkiksi metsänhoito, tallominen ja tuulikaadot. Etenkin maaperään kohdistuva häiriö on kasville tärkeää (Markov, 1991). Riittävä kosteus ja valo ovat myös edellytyksinä lehtopalsamin menestymiseen (Hatcher, 2003).

Laji muodostaa usein tiiviitä mattoja. Aina näin ei ole ja kasvin on havaittu esiintyvän usein esimerkiksi seuraavien lajien kanssa: nokkonen (*Urtica dioica*), hiirenporras (*Athyrium filix-femina*), nurmitädyke (*Veronica chamaedrys*), mesiangervo (*Filipendula ulmaria*), puna-ailakki (*Silene dioica*) ja sananjalka (*Pteridium aquilinum*) (Hatcher, 2003).

Lehtopalsamin levinneisyyden päärajoittajat ovat lämpötila ja kuivuus. Liian aikainen tai myöhäinen kylmyys ovat kasville kohtalokkaita. Lisäksi laji on äärimmäisen tehoton veden käytön suhteen: pienikin määrää liian suoraa auringonvaloa voi olla tarpeeksi saamaan kosteassakin kasvavan

lehtopalsamin nuupahtamaan. Kuivuus myös estää kasvin siementuotannon (Hatcher, 2003). Talven lämpötila, itämisajan sademäärä ja siementen kypsymisajan lämpötila ovat kasville erityisen tärkeitä. Nämä kolme tekijää selittivät Hatcher ym. (2004) tutkimuksessa 80 % kymmenen vuoden tutkimusaikana tapahtuneesta populaatiokoon vaihtelusta. Kylmä talvi johti hyvin toimivaan keväästymiseen (vernalisaatio). Liika kevätsade puolestaan hukuttaa versot. Siementen kypsyminen tapahtuu parhaiten lämpimällä ilmalla.

Suomessa lehtopalsamin yhtenäinen levinneisyysalue painottuu etelään (kuva 2). Oulun seudulle tultaessa levinneisyys on laikuittaista, mikä on tyypillistä levinneisyysalueen reunalla. Maankäyttömuutokset entisestään lisäävät elinympäristöjen hajanaisuutta (Silvertown & Charlesworth, 2001). Laji on Pohjois-Pohjanmaan, Kainuun ja Lapin maakunnissa rauhoitettu (Luonnonsuojeluasetus 160/1997, liite 3 C.) mutta Oulun lehtopalsamien on oletettu olevan puutarhakarkulaisia (Väre ym., 2005) ja niiden rauhoitusstatus on tästä syystä kiistanalainen.



Kuva 2 - Lehtopalsami Suomessa, Kasviatlas 22.1.2019

1.2.2 Lisääntyminen

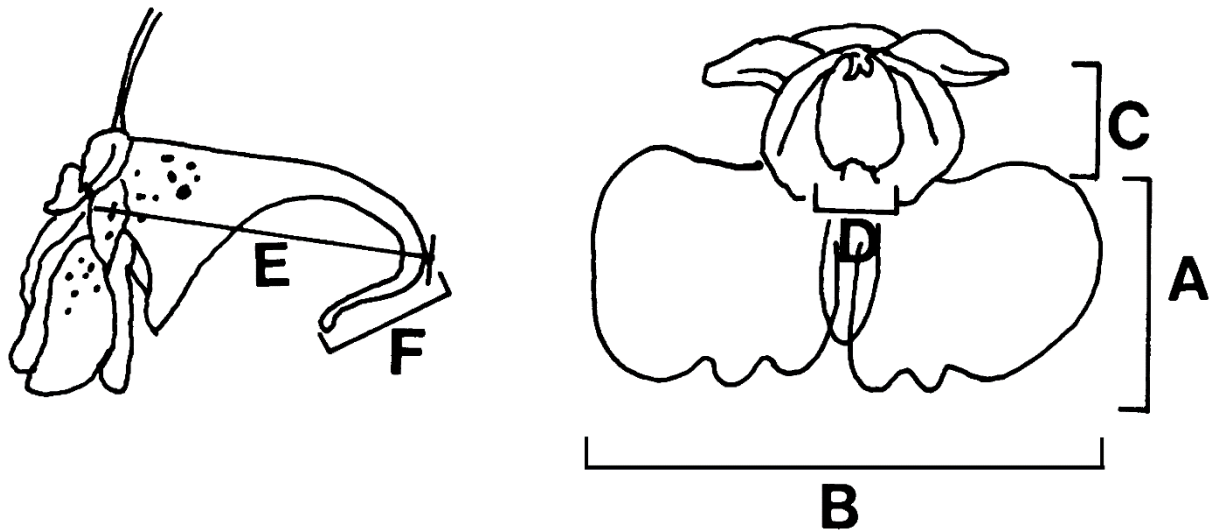
Siementuotto ja siemenpankki ovat lehtopalsamille erityisen tärkeitä. Laji näet lisääntyy ainoastaan siemenistä ja talvehtii ainoastaan siemeninä (Hatcher, 2003).

Kasvin lisääntymisessä tunnusomainen piirre on sen kahdenlaisten kukkien tuotto: se tuottaa ristipölytteisiä näyttäviä kukkia (chasmogamy, CH, Kuva 3) ja umpipölytteisiä aukeamattomia kukkia (cleistogamy, CL) (Masuda ym., 2004). CH-kukat yhdistetään luutamaiseen, haarovaan ja monikukkaiseen fenotyyppiin, CL-kukat puolestaan vähäkukkaiseen ja haarattomaan (Falinska, 1979). Kahdenlaisten kukkien on ajateltu täyttävän kaksi tehtävää: geneettisen monimuotoisuuden lisäämisen ja ylläpidon (CH-kukat), sekä riittävän ja varman siementuotannon (CL-kukat) (Hatcher, 2003). Itsepölytyksen myötä kasvi saa myös tehokkaimmin siirrettyä omia geenejään seuraaville sukupolville, mutta altistuu samalla sukusiitosheikkoudelle, joka on sukusiitoksen aiheuttama

alenema kelpoisuudessa. Täydellisessä itsepölytyksessä syntyy lopulta eriytyneitä homotsygoottilinjjoja. Osittaisella itsepölytyksellä populaation heterotsygotia ei putoa nollaan, eikä sukusiitosheikkous pääse vaivaamaan niin kovasti (Hedrick, 2011). CH-kukkien tuotto on kasville 15 kertaa CL-kukkia kalliimpaa (Masuda ym., 2004)

Erityyppisten kukkien siementuotto vaihtelee. Umpipölytteiset kukat itsepölytyvät aikaisessa kehitysvaiheessa ja tuottavat 1-5 siementä. Pölytyksen tapahduttua ristipölytteiset kukat tuottavat 1-9 siementä. (Falinska, 1979). Japanissakin CL-kukkien todettiin tuottavan keskimäärin vähemmän siemeniä siemenkotaa kohti, mutta siementuotto oli varmempaa kuin CH-kukilla. CL-kukat tuottivat noin 3 siementä kukkaa kohti, kun taas CH-kukat tuottivat keskimäärin noin viisi siementä. Siemententuottovarmuus CL kukille oli 96 % ja CH-kukille 87 %. CH-kukkien tuottamat siemenet ovat myös keskimäärin CL-kukkien siemeniä isompia ja niiden itävyydessä on havaittu eroja (Hiratsuka & Inoue, 1988).

Ristipölytteiset kukat ovat hyönteispölytteisiä. Pölyttäjiä houkutteleva nektari on lehtopalsamilla pitkän kannuksen päässä, joten tärkeimpiä ovat pitkäkärsäiset pölyttäjälajit. Brittein saarilta pölyttäjinä on mainittu kaksi kimalaislajia: tarhakimalainen (*Bombus hortorum*) ja kivikkokimalainen (*Bombus lapidarius*) (Hatcher, 2003; kuva 3). Myös LuontoPortti (2019) mainitsee Suomessa pölyttäjäksi tarhakimalaisen ja lisäksi vielä kirjokimalaisen (*Bombus distinguendus*).



Kuva 3 - Lehtopalsamin hyönteispölytteinen kukka. Kukan keskiarvoinen kokonoin 2x2 cm (Hatcher, 2003)

Ristipölytteisten kukkien luotti on kykenevä vastaanottamaan siitepölyn vasta kukan ponsien pudottua. Laji on siis protandrinen (*protandrous*). Näin kasvin yksittäinen kukka ei voi itsepölyttyä (Hatcher, 2003). Kasvilla ei kuitenkaan ole mitään mekanismia geitonogamian estämiseksi, jossa kukka hedelmöittyy saman kasviyksilön eri kukan siitepölyllä (Masuda ym., 2004). Geitonogamiaa esiintyy erityisesti suurilla monikukkaisilla kasviyksilöillä, joilla aukinaisia CH-kukkia on monta yhtä

aikaa. Tämä ei liene kasville edullista, sillä enemmän resursseja vievän ja epävarmemmin pölyttyvän CH-kukan ristipölytykseen perustuva hyöty on vaarassa. Tästä syystä kukkamäärän mukana CL-kukkien osuus kasvaa. Myös CH-kukkien hedelmällisyyden vaihtelu yleistää CL-kukkia. Esimerkiksi liian kolea tai kostea aika voi estää pölyttäjähönteisten epäaktiivisuuden myötä CH-kukkien pölyttymisen (Masuda ym., 2004). Kasvin erityyppisten kukkien osuus vaihtelee myös kasvupaikan muiden ominaisuuksien mukaan. Białowiezan metsässä Puolassa CL-kukkien määrä oli suurin varjoisammilla metsäosuuksilla ja pienin polkujen varsilla. Kasvit olivat polkujen varsilla myös huomattavasti kookkaampia. CH ja CL kukkien suhde vaikuttaa olevan hyvin plastinen ja yhteydessä saatavilla olevan valon määrään. Varjoisasta metsästä runsaaseen valoon siirretyt kasvit alkoivat tuottaa enemmän CH-kukkia (Falinska, 1979). Yleisesti kasvimaailmassa itsepölytys on yleisintä juuri yksivuotisilla kasveilla. Niillä puolestaan itsepölytyksen on havaittu olevan yleisintä lajien levinneisyysalueiden reunoilla (Silvertown & Charlesworth, 2001). Oululaisten populaatioiden erityyppisten kukkien suhteen tiedetään reagoivan voimakkaasti myös sääoloihin. Sauvojentien populaation on havaittu tuottavan enemmän itsepölytteisiä kukkia kylminä kesinä, mikä voi tosin johtua myös valon määrän vähenemisestä pilvisenä ja sateisena aikana (suullinen tieto, Annamari Markkola).

Kypsä siemenkota räjähtää heittäen siemenet pisimmillään 2-3 metrin päähän. Monet populaatiot kasvavat vesien äärellä, joten veden kuljetuksella ajatellaan olevan merkitystä lajille. Virtaavissa vesissä siemenet tosin vajoavat pohjaan melko nopeasti (Hatcher, 2003). Umpi- ja ristipölytteisiä kukkia tekeillä kasveilla on yleisesti havaittu eroa siementen kulkemassa matkassa. CL-kukat jäävät keskimäärin lähemmäs emoyksilöä kuin CH-kukat. Tästä on hyötynä paikallisiin oloihin sopivan genotyypin pysyminen paikalla (Silvertown & Charlesworth, 2001). Lehtopalsamillakin CL-kukkien on havaittu sinkoavan siemenensä huomattavasti CH-kukkia lyhyemmän matkaa (Hiratsuka & Inoue, 1988)

Lehtopalsamin siemenpankki ei säily muutamaa vuotta pitempään maaperässä. Suurin osa koskaan itävistä siemenistä tekee sen heti seuraavana keväänä hyvin samanaikaisesti. Myöhemmin keväällä itäneet yksilöt eivät menesty aiemmin itäneiden varjostamana. Jotkin siemenistä itävät vasta seuraavana vuonna (Hatcher, 2003). Norjassa populaation on tiedetty kestäneen yhden siemenettömän vuoden (Austad & Skogen, 1990). Kolmesta siemenettömästä vuodesta toipunutta populaatiota ei ole havaittu (Hatcher, 2003). Kasvin siemenet tarvitset itääkseen kylmäjakson (Skálová ym., 2011). Kaikki siemenet eivät idä itsepölytyksen tuoman korkean sukusiitosheikkouden takia välttämättä ollenkaan (Masuda ym., 2004). Pieni populaatiokoko yleistää myös ristipölytteisten kukkien sukusiitosta ja altistaa ne siten sukusiitosheikkoudelle (Frankham ym., 2004).

1.3 Populaatiogenetiikka

1.3.1 Mikrosatelliitit

Mikrosatelliitit ovat laajalti käytössä oleva geneettinen markkerisysteemi populaatiogeneettisessä tutkimuksessa. Niiden etuna on suuri muuntelevuus, periytyminen molemmilta vanhemmilta ja pienen näytemäärän riittäminen. Usein epäinvasiiviset näytteenottomenetelmät riittävät eli kasviyksilöä ei tarvitse tuhota kokonaan, mikä on tärkeää erityisesti uhanalaisia lajeja tutkittaessa. Mikrosatelliitteja käytettäessä työläin vaihe on kehittää jokaiselle lajille omat alukkeet, joiden avulla halutut kohdat saadaan monistettu. Samat alukkeet toimivat usein lähilajien kesken (Frankham ym. , 2004).

Mikrosatelliittien genotyyppityksessä haasteita aiheuttavat monet seikat. DNA:n hajoamisen ja/tai liian alhaisen konsentraation seurauksena alleeli saattaa jäädä monistumatta. Mutaatio alukkeen kohdalla aiheuttaa alleelin systemaattisen monistumattomuuden ja syntyy nolla-alleeli. Erikokoisten alleelien välille voi syntyä epäsuhtaisuutta, sillä lyhyemmät alleelit monistuvat helpommin kuin pitkät. Monistuksessa voi syntyä pätkäistyjä versioita todellisesta alleelistä eli ”änkytystä” (stuttering). Näissä tapauksissa homo- ja heterotsygotteja on vaikea erottaa toisistaan. Yksi virhelähde on myös inhimillinen kirjoitusvirhe. Nämä kaikki aiheuttavat poikkeamaa H-W -tasapainosta. Poikkeama muistuttaa sukusiittoisuuden, Wahlundin efektin tai assortatiivisen parinvalinnan aiheuttamaa poikkeamaa, mutta jättää oman jälkensä, joka voidaan tunnistaa (Van Oosterhout ym. , 2004).

KytKentäepätasapaino (linkage disequilibrium) on toinen mikrosatelliittien (ja monien muiden geenimerkkien) käytössä ilmenevä seikka, joka saattaa tietyissä analyyseissä vääristää tuloksia. KytKentäepätasapainossa kaksi lokusta eivät jostain syystä esiinny ja periydy kahtena erillisenä yksikkönä, vaan niissä alleelit periytyvät toisistaan riippuvaisesti. Neutraalien lokusten välillä vallitseva kytKentäepätasapaino voi johtua monesta syystä. Yksi on lokusten välinen lyhyt fyysinen välimatka, jolloin rekombinaatiota näiden välillä ei pääse niin helposti tapahtumaan. Toinen syy voi olla hiljattain tapahtunut aiemmin erillisten populaatioiden yhdistyminen siten, ettei alleeleilla ole ollut aikaa sekoittua. Erityisesti pienillä populaatioilla syynä voi olla sattuma, pullonkaula tai sukusiittoisuus (Beebe & Rowe, 2008).

1.3.2 Epäsatunnainen pariutuminen

Epäsatunnaisessa pariutumisessa yksilöt lisääntyvät sellaisten yksilöiden kanssa, jotka ovat niitä läheisempää, tai kaukaisempaa sukua kuin populaation keskivertojäsen. Kun gameetit tulevat toisiaan keskivertoa lähempänä olevilta vanhemmilta, puhutaan sukusiitoksesta (Hamilton, 2011). Kasveilla itsepolyytys - sukusiitoksen äärimmäisin muoto - on yleistä. Sukusiitos aiheuttaa

heterotsygotian määrän laskua ja homotsygotian yleistymistä HW-tasapainoon verraten. Tästä seuraa sukusiitosheikkous, sillä homotsygotian nousu nostaa yksilön todennäköisyyttä olla homotsygootti jonkin haitallisen alleelin kannalta. Sukusiitosheikkous alentaa yksilön ja populaation kelpoisuutta. Tavallisesti itsepölytteisillä kasveilla sukusiitosheikkoutta ei esiinny yhtä paljon kuin tavallisesti ristipölytteisillä, sillä haitalliset alleelit saavuttavat nopeasti homotsygotian ja jäävät valinnan vaikutuksesta nopeasti populaatiosta pois (Silvertown & Charlesworth, 2001). Kasveilla on havaittu negatiivinen korrelaatio itsepölytyksen ja sukusiitosheikkouden välillä (Frankham ym., 2004).

Sukusiitos ei vaikuta populaation alleelifrekvensseihin, ainoastaan heterotsygotian määrään. Sukusiitosta kokevat populaatiot eivät ole Hardy-Weinberg -tasapainossa, sillä se johtaa homotsygotian määrän nousuun tasapainoon verrattuna (Silvertown & Charlesworth, 2001).

1.3.3 Hardy-Weinberg -tasapaino

Hardy-Weinberg -tasapainossa tietyt alleelifrekvenssit tuottavat tietyn jakauman hetero- ja homotsygootteja populaatiossa, joka täyttää tietyt odotukset. Odotuksiin kuuluu mm. satunnainen pariutuminen, suuri populaatiokoko sekä luonnonvalinnan ja geenivirran puuttuminen. Mikäli populaatio poikkeaa HW -tasapainosta, jokin tai jotkin oletuksista eivät täsmää (Frankham ym., 2004).

Yksi Hardy-Weinberg -tasapainosta poikkeamaa aiheuttava tekijä on Wahlundin efekti. Wahlundin efektissä tarkasteltu populaatio osoittaa homotsygotian ylimäärää, koska se koostuukin todellisuudessa useammasta erilaistuneesta populaatioista (Frankham ym., 2004).

1.3.4 Geneettinen monimuotoisuus

Geneettinen monimuotoisuus tulee eri yksilöiden ja populaatioiden geneettisistä eroista, jotka voivat johtaa erilaisiin ominaisuuksiin. Riittävä monimuotoisuus on populaatioille tärkeää ympäristön muutoksiin sopeutumisen kannalta (evoluutiopotentiaali). Lajien elinympäristöt ovat jatkuvassa muutoksessa esimerkiksi ihmisen aiheuttaman globaalimuutoksen johdosta. Geneettisesti yksipuoliset populaatiot ovat alttiimpia mm. taudeille ja ne yhdistetään alentuneeseen kelpoisuuteen ja selviytymiseen (Frankham ym., 2004). Monimuotoisuus on erityisen tärkeää lajin levinneisyysalueen reunalla, jossa lajin selviytymiselle kriittiset tekijät vaihtelevat keskeistä levinneisyysaluetta enemmän (Crawford, 2008).

Geneettisen monimuotoisuuden yleisimpiä mittareita ovat polymorfismi, heterotsygotia-aste eli geenidiversiteetti ja alleelirikkaus (A, allelic richness). Polymorfiseksi kutsutaan lokusta, jossa on useampi kuin yksi alleeli - siinä voidaan siis havaita vaihtelua yksilöiden välillä. Havaittu

heterotsygotia-aste on keskiarvo kaikkien tarkasteltujen lokusten heterotsygotiaosuudesta. Odotettu heterotsygotia-aste lasketaan alleelifrekvensseistä olettaen populaation olevan HW-tasapainossa (Frankham ym., 2004). Alleelirikkaus on näytekokoon suhteutettu keskiarvoinen alleelimäärä lokusten yli laskettuna (Beebe & Rowe, 2008). Populaation geneettiseen monimuotoisuuteen vaikuttavat monet tekijät, kuten populaation koko, sen mahdollisesti kokemat pullonkaulat, lajin lisääntymistapa, mutaatiotahti, populaatioiden välinen geenivirta ja näiden kaikkien vuorovaikutus (Frankham ym., 2004).

1.3.5 Efektiivinen populaatiokoko

Efektiivinen populaatiokoko (N_e) kuvaa sitä yksilömäärä, joka ideaalipopulaatiossa käyttäytyisi tarkasteltavan populaation tavoin esimerkiksi menettäen alleeleja ja heterotsygotiaa samaa tahtia. N_e on yleensä yksilömääräistä populaatiokokoa (N) pienempi, sillä oikeat populaatiot poikkeavat ideaalista monin tavoin, kuten paritumalla epäsatunnaisesti ja tuottamalla eri määrän jälkeläisiä. Sukupolvittain vaihteleva populaatiokoko on merkittävin efektiivisen ja varsinaisen populaatiokoon välille eroa aiheuttava tekijä (Frankham ym., 2004).

Populaation efektiivinen koko on suojelubiologiassa merkityksellisempi kuin varsinainen populaatiokoko, sillä se kuvaa populaation selviytymiselle merkityksellisiä muuttujia, kuten monimuotoisuuden häviämistä, paljon todellista yksilömäärää N paremmin. Efektiivisten populaatiokokojen on havaittu olevan tavallisesti vain kymmenesosa varsinaisesta populaatiokoosta. Harvinaisten lajien (ja muidenkin) pienet populaatiot voivat siis menettää monimuotoisuuttaan hyvinkin nopeasti (Frankham ym., 2004).

1.3.6 Populaation pullonkaula

Pullonkaula saattaa selittää suurenkin populaation pientä geneettistä monimuotoisuutta (Beebe & Rowe, 2008). Populaation pullonkaulaksi kutsutaan tapahtumaa, jossa populaation koko pienenee yhden tai useamman sukupolven ajaksi. Pullonkaulan myötä populaatiosta katoaa etenkin harvinaisempia alleeleja. Vaikutukset ovat sitä suurempia, mitä pitempi pullonkaulan kesto on ja mitä pienemmäksi populaatiokoko laskee. Koon laskun nopeudella on myös merkitystä. Hidas lasku antaa luonnonvalinnalle aikaa toimia. Nopea taas saattaa tuoda haitallisetkin alleelit suuriin frekvensseihin geneettisen ajautumisen – sattuman – myötä (Beebe & Rowe, 2008).

Pullonkaulan vaikutuksesta alleelien määrä vähenee nopeasti toisin kuin heterotsygotian määrä. Heterotsygotia-asteen vaste pullonkaulalle tulee usein useita sukupolvia pullonkaulan jälkeen. Tänä aikana tapahtunut pullonkaula voidaan havaita heterotsygotian ylimäärästä alleelimäärään nähden. Neutraaliteorian mukaan mutaatio-ajautuminen -tasapainossa tietty taso heterotsygotiaa liittyy

tietyyn alleelimäärään. Tämä poikkeaa Hardy-Weinberg -tasapainosta, sillä se laskee heterotsygotian havaituista alleelifrekvensseistä (Beebe & Rowe, 2008).

Perustajavaikutukseksi kutsutaan pullonkaulan muotoa, jossa muutama yksilö siirtyy uuteen elinympäristöön ja perustaa sinne uuden populaation. Tämä voi seurata luonnollisesta kolonisaatiosta tai ihmisen mukanaan siirtämistä yksilöistä. Tässä pullonkaulan syvyys ja voimakkuus tulee siirtyneiden yksilöiden määrän rajallisuudesta. Populaatioon siirtyvät vain näiden perustajayksilöiden mukanaan tuoma geneettinen monimuotoisuus. Pullonkaulan vaikutus uuden populaation geneettisen monimuotoisuuteen on sitä suurempi, mitä kauemmas perustajat siirtyvät. Siirretty matka vaikuttaa todennäköisyyteen ”täydennysperustajien” ja geenivirran saapumisesta populaatioon kenties tuoden mukanaan uusia alleleja (Beebe & Rowe, 2008).

1.3.7 Populaatiorakenne

Kasviyksilöiden liikkuvuus on hyvin rajattua, joten ristipölytteisilläkin lajeilla populaatioiden on hyvin vaikea saavuttaa satunnaista pariutumista. Tästä syntyy paikkaan sidottua geneettistä vaihtelua, eli populaatiorakennetta. Vaihtelu on vielä suurempaa lajeilla, joilla tapahtuu itsepölytystä (Silvertown & Charlesworth, 2001).

Mitä vähemmän geenivirtaa ja migrantteja siitepölyn tai siementen muodossa liikkuu populaatioiden välillä, sitä todennäköisempää on, että kaksi samasta populaatiosta otettua yksilöä ovat saaneet perimänsä yhteiseltä esivanhemmalta. Sukusiitos, rajoittunut liikkuvuus, geneettinen ajautuminen ja paikalliset sopeutumiset aiheuttavat populaatiorakennetta ja voivat johtaa hyvin homogeenisiin ja vähän vaihteleviin alapopulaatioihin, mutta korkeaan kokonaisvaihteluun. Monimuotoisuuden sijoittuminen eri tasoille populaatioissa voi kertoa paljon niiden ominaisuuksista (Silvertown & Charlesworth, 2001).

1.3.8 Geenivirta

Aikuiset kasvit harvoin liikkuvat populaatiosta toiseen. Kasveilla geenivirta populaatioiden välillä ja sisällä tapahtuu lähinnä siemeninä ja siitepölynä. Näistä vain siemenet kykenevät perustamaan uusia populaatioita. Siitepöly tuo geeninsä vain olemassa oleviin populaatioihin. Siitepölyn liikkuvuuteen vaikuttaa kasvin pölytystyyli. Hyönteispölytteisten kasvien siitepöly liikkuu vain niin pitkälle kuin pölyttäjähönteiset. Suurin osa pölytyksistä tapahtuu melko lähellä olevien kasvien kesken, geitonogamiassa saman kasvin eri kukkien välillä. Eläimet ja tuuli voivat kuljettaa myös siemeniä, jotka siitepölyn lailla päätyvät todennäköisimmin lähelle lähtöpistettään (Silvertown & Charlesworth, 2001).

Populaatioiden välisistä yhteyksistä on olemassa monenlaisia malleja. Metapopulaatiomallissa toisiinsa kytköksissä olevat osapopulaatiot voivat kadota ja uudelleen kolonisoitua suurempien ja vakaampien populaatioiden avulla (Silvertown & Charlesworth, 2001). Geenivirran ollessa heikkoa, geneettisen ajautumisen vaikutus on suuri. Geneettinen ajautuminen perustuu sattumaan ja loppujen lopuksi päättyy alleelin katoamiseen tai fiksoitumiseen (Silvertown & Charlesworth, 2001).

Levittäytyminen levinneisyysrajan yli vaatii geenivirran katkeamisen keskemällä sijaitseviin populaatioihin, jotta uudensijaitseminen oloihin sopeutuminen voisi tapahtua. Geenivirta on tärkeää monimuotoisuuden ylläpitämiseksi, sen katkeaminen taas lajiutumisen kannalta. Yksivuotisilla kasveille levinneisyysrajat ovat usein selkeitä. Rajan väärällä puolella populaatioiden on vaikea perustua pysyviksi. Levinneisyysalueiden reunalla sijaitsevat eristyneet populaatiot ovat siis usein merkittäviä lajiutumisen kannalta. (Silvertown & Charlesworth, 2001). Toisaalta geenivirta on tärkeää populaatioiden pitkän ajan selviämisen ja hyödyllisten alleelien leviämisen kannalta (Segelbacher ym., 2010)

Geenivirta populaatioiden välillä voi johtaa myös ”ristipölytysheikkouteen” (outbreeding depression), jossa geneettisesti erilaistuneet yksilöt lisääntyvät keskenään tuottaen huonommin kelpoisen jälkeläisen. Syynä voi olla paikallisiin oloihin sopeutunut genotyyppin harvinaistuminen tai menetys geenivirran takia. Tämä voi myös estää lajin leviämisen uusille alueille ja lajiutumisen. Yhden efektiivisen migrantin sukupolvessa on havaittu estävän erilaistumisen (Beebe & Rowe, 2008).

1.4 Hypoteesit ja työn tarkoitus

Tutkin tässä työssä lehtopalsamin geneettistä muuntelua ja populaatioiden rakennetta levinneisyysalueen keski- ja reunaosissa. Keskeistä sijaintia edustaa Harjavallan populaatio ja reunaa Oulun seudun populaatiot. Tutkimuksen päämääränä on selvittää erityisesti Oulun seudun lehtopalsamipopulaatioiden välisiä suhteita.

Levinneisyysalueen reunalla vallitsevien epäedullisempien olosuhteiden johdosta näiden maantieteellisesti eristyneimpien populaatioiden odotetaan olevan eristyneimpiä myös geneettisesti ja lisääntyvän eniten itsepölytyksen kautta, kun taas levinneisyyden keskellä niiden odotetaan muuntelevan eniten (reuna vs. keskuspopulaatiot) ja lisääntyvän sekä risti- että umpipölytteisten kukkien avulla. Populaatioilla odotetaan ilmenevän pullonkauloja perustajavaikutuksen seurauksena, eikä niiden koko ja geneettinen muuntelu korreloi tästä syystä. Oulun populaatioita oli kaikkiaan kahdeksan, Utajärveltä kaksi populaatiota, Viinivaaran lähteiden Hämyhete ja Hanganhete, ja Pudasjärveltä Venkaan lähteen populaatio. Alkuperiä populaatioilla on useita, sekä luonnonpopulaatioista, että ihmisen levittämiä. Kasvitieteellisen puutarhan populaation oletetaan

olevan hyvin muunteleva sen tunnetun monipuolisen alkuperän takia. Viinivaaran ja Venkaan lähteiden oletetaan olevan luonnonpopulaatioita.

2 Aineisto ja menetelmät

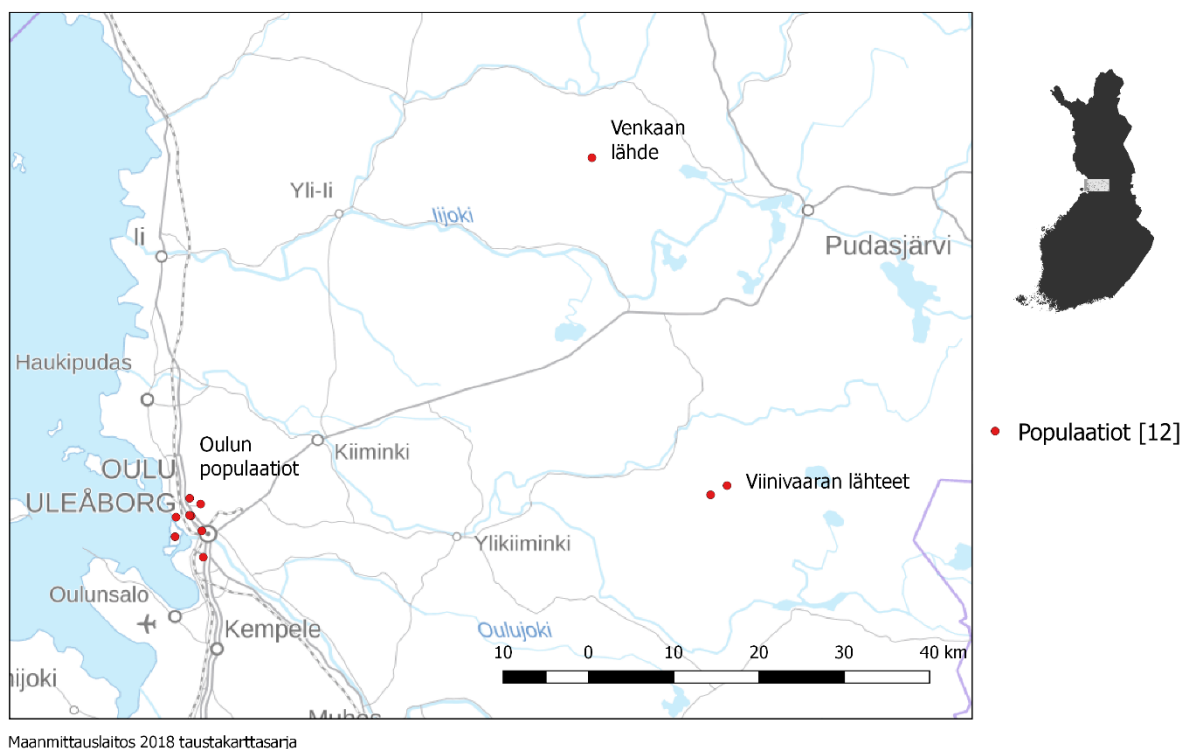
2.1 Tutkimuspopulaatiot

Populaatioita löydettiin Pohjois-Pohjanmaalta toistakymmentä ja Harjavallasta mukaan otettiin yksi populaatio. Oulusta populaatioita oli kartoitettu edeltävänä vuonna etukäteen. Kaupungin ulkopuoliset lähipopulaatiot selvitettiin Oulun yliopiston kasvimuseon kokoelmista vanhoista uhanalaisuuskorteista ja kasvinäytteiden paikkatiedoista. Oulusta kerättiin näytteet noin 14 populaatiosta. Utajärveltä kerättiin kaksi populaatiota, Viinivaaran lähteiden Hämyhete ja Hanganhete. Pudasjärveltä näytteet kerättiin Venkaan lähteen populaatiosta. Muutamia populaatioita löydettiin lisää ja muutamien huomattiin kadonneen.

Löydettyjen populaatioiden yhteismäärä kasvoi turhan suureksi, joten pois jätettiin populaatiot, jotka voitiin kohtalaisella varmuudella olettaa lähiaikojen puutarhakarkulaisiksi. Esimerkiksi Oulun Syynimaan populaatioista toinen oli suoraan yhteydessä moneen kotipuutarhaan ja toinen oli löydetyn puutarhajätteen sijoituspaikan läheisyydessä, myös kotipuutarhojen likellä. Jäljelle jäi 8 oululaista populaatiota.

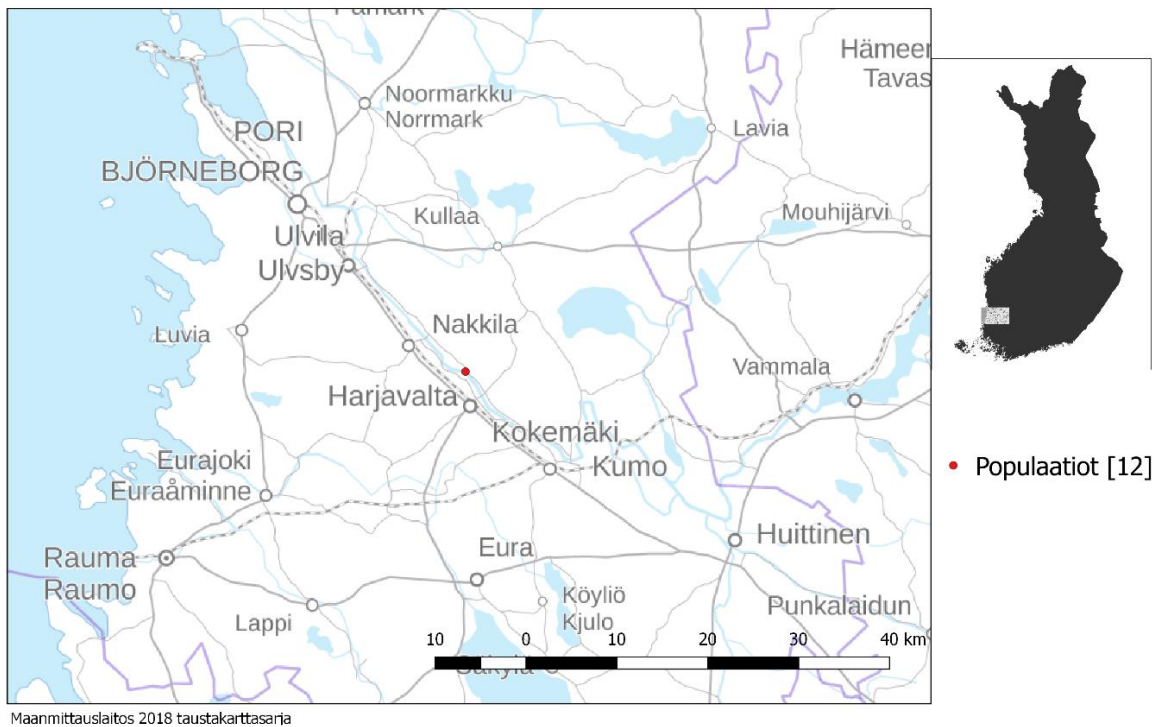
Mukaan otettiin 11 populaatiota Pohjois-Pohjanmaalta (kuva 4) ja yksi Satakunnasta (kuva 5).

Oulun seudun populaatioiden sijainti



Kuva 4 - Oulun seudun populaatioiden sijainti

Harjavallan populaation sijainti



Kuva 5 - Harjavallan populaation sijainti

2.1.1 Hietasaari

Hietasaaren populaatio (kuvat 6 ja 7) löytyy ihmissilmälle melko ryteikköiseltä Pauhupolun ja Maininkipolun väliin sijoittuvalta lehtometsäkaistaleelta. Populaatio on tiheimmillään hiljattain kaatuneen tuomen ympärillä ja harvenee muun kasviston sekaan aukon ympärille. Muita kasveja paikalla olivat: puna-ailakki (*Silene dioica*), herukat (*Ribes*), nokkonen (*Urtica dioica*), koiranputki (*Anthriscus sylvestris*), karhunputki (*Angelica sylvestris*) ja vadelma (*Rubus idaeus*). Populaation kasvien on havaittu kukkivan keltaisena. Populaation koko on noin 5000 yksilöä.



Kuva 6 - Hietasaaren populaatio



Kuva 7 - Hietasaaren populaatio

2.1.2 Hämyhete

Hämyhetteen populaatio (kuvat 8 ja 9) sijaitsee Utajärvellä Hämyojan lähteellä, joka on osa Viinivaaran lähdekokonaisuutta. Populaatio kasvaa pienen puroverkoston alueella paikoin hyvinkin tiheänä. Hete kuuluu Osmo Paldaniuksen luonnonsuojelualueeseen ja on METSO-kohde. Tällä paikalla muita huomattavia lajeja olivat; lehtotähtimö (*Stellaria nemorum*), mesiangervo (*Filipendula ulmaria*), pohjanhorsma (*Epilobium hornemannii*), suoputki (*Peucedanum palustre*), karhunputki (*Angelica sylvestris*), hiirenporras (*Athyrium filix-femina*) ja tesma (*Milium effusum*). Populaation

koko oli noin 8000 yksilöä. Ympäriällä on saniaislorpea (FCG Suunnittelu ja tekniikka, Pöyry Finland, & Ramboll Finland, 2017). Oulun kasvimuseonkokoelmista löytyy lehtopalsaminäyte paikalta vuodelta 1997.



Kuva 8 - Hämyhetteen populaatio



Kuva 9 - Hämyhetteen populaatio

2.1.3 Harjavalta

Harjavallan populaatio (kuvat 10 ja 11) sijaitsee Paratiisilehdon alueella Kokemäenjoen törmällä. Harjavallasta vanhin lehtopalsaminäyte löytyy vuodelta 1918. Tarkempaa tietoa kyseisen havainnon sijainnista ei oltu mainittu, mutta Paratiisin alueelta havaintoja on vuodesta 1994 lähtien. Osa näytteistä kerättiin alueelle kulkevan hiekkatien ojanpenkalta, jossa muina lajeina mm ranta-alpia (*Lysimachia vulgaris*), terttuseljaa (*Sambucus racemosa*), ojakellukkaa (*Geum rivale*), nokkosta (*Urtica dioica*) ja karhunputkea (*Angelica sylvestris*). Loput näytteistä kerättiin varsinaisen lehdon puolelta, jossa esiintyi mm jättipalsamia (*Impatiens glandulifera*), sudenmarjaa (*Paris quadrifolia*), nokkosta (*Urtica dioica*), hiirenporrasta (*Athyrium filix-femina*), terttuseljaa (*Sambucus racemosa*), tuomea (*Prunus padus*), harmaaleppää (*Alnus incana*) ja puna-ailakkia (*Silene dioica*). Keräyshetkellä lehtopalsamit kukkivat ristipölytteisin suurin kukin. Populaation koko on noin 10 000 yksilöä.



Kuva 10 - Harjavallan populaatio



Kuva 11 - Harjavallan populaatio

2.1.4 Hanganhete

Hanganhetteen populaatiota (kuvat 12 ja 13) ei ollut mainittu Oulun yliopiston kasvimuseon kokoelmissa tai uhanalaisten lajien korteissa. Paikka sijaitsee lähellä Hämyojanhetettä ja on oululaisten luontoharrastajien tiedossa. Myös Hanganhete kuuluu Viinivaaran lähteisiin. Palsamit olivat täällä vaatimattoman kokoisia ja kasvoivat lähdepinnalla sammaleella harvaihkona mattona suurten kuusten ja koivujen alla. Kuivemmilla kohdilla kasvoi suuria saniaistuppaita. Täällä muita lajeja olivat lehtotähtimö (*Stellaria nemorum*), hiirenporras (*Athyrium filix-femina*) ja rentukka (*Caltha palustris*). Hanganhetteellä lehtopalsami on tehnyt ristipölytteisiä kukkia ainakin vuonna 2012 (Saara Salmela, suullinen tiedonanto). Populaation koko oli noin viitisen tuhatta yksilöä. Lähteen ympärillä on lehtokorpea ja lehtomaista kangasta (FCG Suunnittelu ja tekniikka ym., 2017).



Kuva 12 - Hanganhetteen populaatio



Kuva 13 - Hanganhetteen populaatio, Kuva: Saara Salmela 2012

2.1.5 Karjasilta

Karjasillan populaatio sijaitsee omakotitalon pihan varjoisimmilla melko rehevillä paikoilla. Pääesiintymä on tammen alla. Pisimmät kasviyksilöt lähentelivät 1,5 metrin pituutta. Populaatiokoko on n. 400 yksilöä 50 m² alueella. Palsamit kukkivat kesäisin ristipölytteisin kukin. Populaation tiedetään saaneen alkunsa n. 20 vuotta sitten Sauvojentien populaatiosta siirretyistä yksilöistä.

2.1.6 Kasvipuutarha

Kasvipuutarhan populaatio kasvaa Oulun yliopiston kasvitieteellisen puutarhan lehtokasviosiossa järven rantamilla. Lehtopalsamit ovat huomattavan pieniä ja ovat muiden lehdon kasvien, mm vuohenputken (*Aegopodium podagraria*), varjostamia. Populaatiokoko on myös vaatimaton, alle 100 yksilöä. Siemenvaihtoa on puutarhan tietokantojen mukaan ollut Saksasta, Englannista, Pälkäneeltä ja Lammilta. Osa tuoduista populaatioista on hävinnyt, mutta todennäköisesti jättänyt jälkensä jäljelle jääneisiin palsameihin. Tätä populaatiota pidetään mahdollisena lähdepopulaationa muille Oulun kaupunkialueen populaatioille. Kasvitieteelliseltä puutarhalta on siirretty maamassoja kaupungin alueella ja ihmiset ovat voineet kuljettaa siemeniä puutarhalta.

2.1.7 Pohjantie

Pohjantien populaatio sijaitsee Pohjantien ja sen länsipuolella kulkevan lenkkipolun välisellä meluvallilla. Paikka on lehtopalsamille epätyypillisen kuiva harvennettu mäntysekametsä. Populaation koko oli noin 50-100 yksilöä. Lehtopalsamin siementen arvellaan tulleen meluvalliin käytetyn maa-aineksen mukana vuosituhannen vaihteessa. Maa-ainesta on tuotu valliin mm. entisen Tuiran aseman pihapiiristä.

2.1.8 Pyykösjärvi

Pyykösjärven populaatio (kuvat 14 ja 15) kasvoi Pyykösjärven rantamilla pihapiirien ja järven välissä koivumetsikössä. Huomattavimpana alueella kasvoi korpikastikka (*Calamagrostis phragmitoides*) polvenkorkuisena kasvustona seuranaan muutaman metrin mittaisia puuntaimia (harmaaleppää (*Alnus incana*), raitaa (*Salix caprea*) ja pihlajaa (*Sorbus aucuparia*)). Muita lajeja alueella olivat jättipalsami (*Impatiens glandulifera*), terttualpi (*Lysimachia thyrsiflora*), vehka (*Calla palustris*), metsäälvejuuri (*Dryopteris carthusiana*) ja metsäkorte (*Equisetum sylvaticum*). Populaation koko oli noin 100 000 yksilöä ja se ulottui noin 30*80 m alueelle.



Kuva 14 - Pyykösjärven populaatio



Kuva 15 - Pyykösjärven populaatio

2.1.9 Sauvojantie

Sauvojantien populaatio sijoittuu suojaiselle pensasaidoin rajatulle rivitalopihalle, jota suuri pihlaja varjostaa. Populaatio on hyvin tiheä ja rehevä vaikka rajoittuukin vain pienelle alueelle. Populaatiokoko on noin 2000 yksilöä. Kasvit tuottavat täällä ristipölytteisiä isoja kukkia, epäsuotuisalla ilmalla tai varjostettuna tosin vähemmän. Populaatio on todennäköisesti saanut alkunsa Pohjantien populaatiosta ihmisten ja lemmikkien mukana kulkemista siemenistä.

2.1.10 Toppila

Toppilan populaatio (kuvat 16 ja 17) sijaitsee frisbeegolf -kentältä etelään vievän pyörätien varrella ja ympäröivässä metsässä, sekä tieltä itään suuntaavalla puustosta hiljattain raivatulla alueella. Populaatio oli miljoonia yksilöitä ja kattoi koko raivatun jäljen ulottuen mattona vielä pitkälle metsän puolelle ja pikkuhiljaa harveten vielä pidemmälle. Raivatulla alueella lehtopalsami muodosti tiiviin kasvuston. Paikoitellen nokkosia puski palsamimaton läpi. Ojanpenkalla ja pyörätien varrella kasvoi lehtopalsamin lisäksi nokkosta, maitohorsmaa (*Epilobium angustifolium*), puna-ailakkia (*Silene dioica*), herukoita (*Ribes*), koiranputkea (*Anthriscus sylvestris*) ja muutama jättipalsami (*Impatiens glandulifera*). Populaation kasvit tuottavat ristipölytteisiä kukkia. Oulun yliopiston kasvitieteellisen puutarhan henkilökunnan mukaan Toppilan palsamipopulaatio on syntynyt Kasvitieteelliseltä puutarhalla Toppilaan vietyjen maamassojen välityksellä (Tauno Ulvinen, suullinen tiedonanto). Populaation kasvupaikalle on sittemmin perustettu asuinalue ja populaatio elää jäljelle jääneellä metsäkaistaleella hyvin vaatimattoman kokoisena.



Kuva 16 - Toppilan populaatio



Kuva 17 - Toppilan populaatio

2.1.11 Vällivainio

Vällivainion populaatio sijaitsee puutarhan ja pyörätien välisessä ojassa ja sen pientareilla, sekä viereisen puutarhaliikkeen alueella. Paikka on rehevä. Palsamien seurana kasvavat mesiangervot ja nokkoset. Keltaisia ristipölytteisiä kukkia on havaittu. Populaation koko on noin 5000 yksilöä. Populaatio on yksi mahdollinen lähdepopulaatio muille, sillä puutarhaliikkeestä moni on voinut palsamin kantaa kotiinsa.

2.1.12 Vengas

Venkaan populaatio (kuvat 18 ja 19) sijaitsee Pudasjärvellä Venkaan lähteellä. Populaatio on tunnettu 1960-luvulta lähtien. Ensimmäinen näyte museon kokoelmissa on vuodelta 1967. Museotiedoissa mainitaan lajin kasvaneen myös lähdepuron varrella. Sieltä kasvia ei näytteenottovuonna löydetty. Populaatio sijoittuu lähteestä hieman ylävirtaan hetteiköllä, jossa lehtopalsami kasvaa tihkupinnalla runsaana vaatimattoman kokoisina ja haarattomina. Populaation koko oli ainakin 10 000 yksilöä. Näytteet kerättiin vasta alkusyksystä ja keskeisimmällä hetteiköllä kasvit olivat jo hallan ruskistamia. Lähteellä kasvillisuus on hyvin mesiangervopitoista. Sammallajeista mainittakoon *Bryum beigelii*, *Philonotis* ja *Rhizomnium* sekä *Marchantia polymorpha*. Aluetta kuvaavia putkilokasvilajeja taas ovat: mesiangervo (*Filipendula ulmaria*), suohorsma (*Epilobium palustre*), pohjantähtimö (*Stellaria borealis*), pohjannurmikka (*Poa alpigena*) ja metsäkorte (*Equisetum sylvaticum*). Lähteen ympärillä on pienialaista lehto- ja lähdekorpea (FCG Suunnittelu ja tekniikka ym., 2017).



Kuva 18 - Venkaan populaatio



Kuva 19 - Venkaan populaatio

2.2 Näytteenotto

Tunnetuista ja uusista löydetystä oululaisista lehtopalsamipopulaatioista kerättiin kesän 2016 aikana kustakin näytteet 30 kasvista (taulukko 1). Pyykösjärven populaatiosta yksi näyte katosi, joten sieltä näytemäärä on vain 29. Lisäksi kerättiin vastaavat näytteet kolmelta lähteeltä Oulun seudulta:

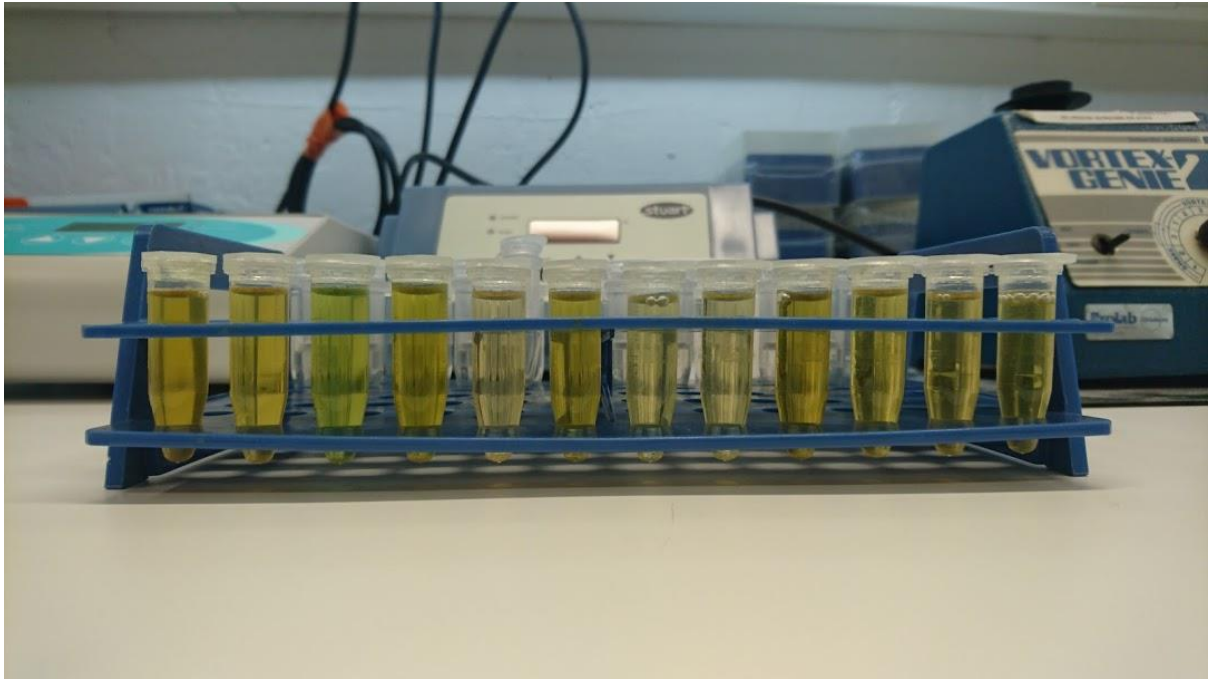
Hanganhetteeltä, Hämyhetteeltä ja Venkaan lähteeltä, sekä eteläisestä Harjavaltaisesta lehdestä. Näytteeksi otettiin lehtopalsamia kokonaisesta kasvista muutamaa lehteen kasvin koosta riippuen. Näytteet kerättiin pieniin muovipusseihin ja säilytettiin pakkasessa lukuun ottamatta Harjavallan näytteitä, jotka säilöttiin kuivumaan silica -geeliin.

Taulukko 1 - Tutkimuspopulaatiot lyhenteineen ja keruupäivineen

Populaation nimi	Lyhenne	Näytteiden keruu pvm	otos
Hietasaari	H	21.6.2016	30
Hämyhete	Hae	29.8.2016	30
Harjavalta	Har	29.7.2016	30
Hanganhete	Hh	29.8.2016	30
Karjasilta	Ka	29.6.2016	30
		19.6.2016/	10/
Kasvipuutarha	Kp	3.7.2016	20
Pohjantie	P	3.7.2016	30
Pyykösjärvi	Py	22.6.2016	29
Sauvojantie	Sa	2.7.2016	30
Toppila	T	21.6.2016	30
Välivainio	V	24.6.2016	30
Vengas	Ven	29.8.2016	30

2.3 DNA:n eristys

Näytteistä eristettiin DNA käyttämällä kahta kaupallista eristyspakkausta Mo Bio Laboratories, Inc.:ltä: UltraClean® Plant DNA Isolation Kit (Pohjantien populaatio ja Hietasaaren populaatiosta näytteet H1-8) ja PowerpPlant® PRO DNA Isolation Kit (lopun näytteet). Ennen eristystä näytteitä pyrittiin homogenisoimaan ensin leikaten ne petrimaljan päällä pieneksi silpuksi. Muutaman satsin jälkeen siirryttiin murskaamaan näytteet huumareella, joka tiskattiin ja kuivattiin joka näytteen välissä. Itse eristys tehtiin noudattaen valmistajan ohjeita (kuva 20). Eristysprotokollassa oli vaihtoehtona käyttää fenolien erotusliuosta (Phenolic Separation Solution). Tätä käytettiin näytteille H25-30 ja T1 ja T2. Eristyksien DNA-pitoisuus mitattiin käyttäen Nanodrop® ND-1000 spektrofotometriä.



Kuva 20 - Näytteitä eristysvaiheessa, näytteiden välillä oli suuri värieroja.

2.4 Mikrosatelliitit

Mikrosatelliittialukkeiksi valittiin samat, joita jättipalsamipopulaatioita Helsingin kaupungin alueella tutkinut Marton (2011) käytti. Alukkeet (taulukko 2) on suunniteltu jättipalsamille, eikä niitä tiettävästi ole aiemmin käytetty lehtopalsamilla.

Taulukko 2 - Mikrosatelliittilokusten alleelikoot (bp=emäsparia), forward-alukkeen leima, alukkeiden sekvenssit (päällä forward, alla reverse) ja lähdeartikkelit (Provan ym. , 2007; Walker ym., 2009).

	Lokus	Koko (bp)	Leima	Sekvenssi	Lähde
1	IGNSSR 101	106-118	FAM	ACGACAAGCGGAGTCATTCT AAGAAAGCACGGCAGAGAGT	Provan ym. (2007)
2	IGNSSR 104	116-126	VIC	CCACCATACCTTCTTCTCCTG GTTGCCCCGAAGTAGACATT	Provan ym. (2007)
3	IGNSSR 106	111-135	PET	CCTGTTTCATATTCAGACCCAAA ATAATTGCATGCCCCATT	Provan ym. (2007)
4	IGNSSR 203	142-148	NED	CAAAGGGCGACGGTTTCT TTCCATGGACAATTCCTTCA	Provan ym. (2007)
5	IGNSSR 103	126-142	PET	GCCCCCAAAGAAAGAAACA TCATTCAAAGCAGCCTTCT	Provan ym. (2007)
6	A21 (IGA 21)	315-361	FAM	ACTCTTCTGGCTAAGCTG AAAGCGAGAAGTTGGCG	Walker ym. (2009)
7	IGNSSR 210	123-132	FAM	CCAGAGAGGTGGAGGTTCAA GAAAGCAGGTTCCGTCGATA	Provan ym. (2007)
8	IGNSSR 213	137-153	VIC	TGATGGATGGATGGTCCAAT CCATCTCCCATCTCCATCTG	Provan ym. (2007)
9	IGNSSR 240	140-160	NED	CGGCTTCTGATTCACGAAAT TGCTAACCGGATTCTTCTGG	Provan ym. (2007)
10	A2 (IGA 2)	304-334	PET	ACCACGGACGCAAGTGA GCAAGAGAAGTTGGCGGAA	Walker ym. (2009)
11	A3 (IGA 3)	334-350	FAM	ACTTCCATGTGTTATTGA TGAAAGATGGGTTACATT	Walker ym. (2009)

Alukkeita oli yhteensä 11 ja ne jaettiin kahteen ryhmään ABI-lukua varten. Primermix 1 (PM1) ryhmään otettiin IGNSSR 101, IGNSSR 104, IGNSSR 106, IGNSSR 203 ja A3 (IGA 3). Primermix 2 (PM2) ryhmään otettiin IGNSSR 103, A21 (IGA 21), IGNSSR 210, IGNSSR 213, IGNSSR 240 ja A2 (IGA 2). Alukesekoituksiin laitettiin aluksi kutakin aluketta 2 µl sekä R että F versiota ja tasattiin sitten steriilillä vedellä 100 µl tilavuuteen. Jotkin lokukset eivät tahtoneet monistua, joten muutamaa aluketta laitettiin enemmän (PM1: IGNSSR 104: 3 µl, IGNSSR 203: 3 µl, IGA 3: 4 µl; PM2: IGA 21: 4 µl, IGA 2: 4 µl). IGNSSR 203 kohdalla tämän todettiin tuottaneen huonomman tuloksen, joten määrä laskettiin takaisin 2 µl. IGA 2 ei toiminut muutoksista huolimatta lainkaan ja se jätettiin pian pois.

2.5 PCR

PCR suoritettiin 96 kaivon kuoppalevyillä siten, että jokaiseen kaivoon tuli 3 µl mastermixiä, 0,4 µl vettä, 0,6 µl alukeseosta (puoleen PM1 ja puoleen PM2) sekä 2 µl eristettyä templaatti-DNA:ta. Levyjen näytejärjestys otettiin ylös taulukoihin. PCR-ohjelma aloitettiin 95°C 15 minuuttia aktivaatiolla, joka myöhemmin pudotettiin 5 minuuttiin haihtumisen vähentämiseksi. 35 kierron syklinä laitteella Bio Rad T100 Thermal Cycler oli seuraava: denaturaatiovaihe 94°C 30 s, alukkeiden liittymisvaihe 90 s ensimmäiset ajot 60°C, sittemmin laskettiin 57°C, pidentyminen 60 s 72 asteessa. Lopullinen pidennys 60°C 30 minuuttia. Loppuaika 4°C kunnes levy vietiin fuugauksen kautta pakkaseen. Fuugaukseen käytettiin laitetta Eppendorf Centrifuge 5430.

2.6 Agarosielektroforeesi

Jokaiselta PCR-levylliseltä otettiin 24-46 näytettä, jotka ajettiin geelillä laitteella Labnet International INC GEL XL Ultra v-2. Geeliin käytettiin 80 ml TBE-liuosta, 1,2 g agarosia ja 2,5 µl Midori Green -väriä. Geeliä ajettiin 40 minuuttia 100 voltin jännitteellä. Geeliä tarkasteltiin Bio Rad Gel Doc EZ Imagerin avulla.

2.7 Alleelikokojen määrittäminen

PCR-tuotteiden tarkka koko määritettiin ABI 3730 automaattisekvenaattorilla. Tätä varten näytteet siirrettiin koodillisille ABI-levyille (pestyille). Joka kaivoon tuli 8 µl formamidia ja 0,30 µl LIZ 500 -kokostandardia, sekä enintään 1,5 µl PCR-tuotetta. Levyt suljettiin tarralevykannella ja vietiin pakastimeen odottamaan käsittelyä. Havaitut alleelikoot määritettiin GeneMapper 5.0 (Life Technologies®) ohjelmalla, koottiin taulukoksi ja tuloksen mukaan tehtiin muutoksia käytettyihin menetelmiin.

2.8 Analysointi

2.8.1 Kytkentäepätasapaino, Hardy-Weinberg -tasapaino ja nolla-alleelit

Kytkentäepätasapainon ilmenemistä testattiin Genepop 4.2 -ohjelman (Raymond & Rousset, 1995; Rousset, 2008) vaihtoehdolla 2 (Linkage Disequilibrium). Asetukset pidettiin ohjelman oletuksissa testaten jokainen lokuspari jokaisesta populaatiosta käyttäen log-todennäköisyysuhdetta (Dememorization number: 1000, Number of batches: 100, Number of iterations per batch: 1000).

Hardy-Weinberg -tasapainoa testattiin Genepop 4.2 -ohjelmalla. Heterotsygotian ylimäärää testattiin populaatioittain ja lokuksittain ohjelman oletusasetuksilla. Odotetut ja havaitut heterotsygotiat laskettiin ohjelmalla Genepop 4.2.

Nolla-alleelien esiintyminen tarkistettiin Micro-Checker v.2.2.3 -ohjelmalla (Van Oosterhout ym., 2004). Ohjelma erottaa genotyyppitysvirheet johtuen nolla-alleeleista, lyhyiden alleelien dominanssista ja “änkytyksestä” monistuksessa (*stuttering*). Micro-Checker pystyy myös erottamaan sukusiittoisuuden ja Wahlundin efektin nolla-alleelien aiheuttamasta H-W -poikkeamasta. Lisäksi ohjelma havaitsee inhimilliset naputteluvirheet (Van Oosterhout ym., 2004).

2.8.2 Geneettinen monimuotoisuus ja F_{IS}

Odotetut heterotsygotiat laskettiin Arlequin v.3.11-ohjelmalla (Excoffier ym., 2017). Alleelimäärien tarkasteluun käytettiin myös Arlequin-ohjelmaa. Alleelirikkaudet laskettiin FSTAT -ohjelmalla (Goudet, 2001). Alleelirikkauksia verrattiin populaatioiden kokoihin laskemalla niille korrelaatiokerroin Excel -ohjelman CORREL-funktiolla. Kertoimelle laskettiin myös p-arvo.

Populaation odotetun ja havaitun heterotsygotian erot voivat viitata epäsatunnaiseen pariutumiseen. Sukusiitoskerroin F_{IS} mittaa havaitun heterotsygotian poikkeamaa verraten alapopulaation odotettuun heterotsygotiaan HW-tasapainossa. Kerroin lasketaan kaavalla: $F_{IS} = (H_s - H_i)/H_s$, jossa H_s on alapopulaatioiden odotetun heterotsygotian keskiarvo ja H_i alapopulaatioiden havaitun heterotsygotian keskiarvo. Kertoimen arvot vaihtelevat -1-1 välillä, negatiivisia arvoja voi olla, jos kyseessä on heterotsygotian ylimäärä. Populaatiossa ei havaita homotsygotian ylimäärää, jos F_{IS} on 0, kun taas populaatio on täysin homotsygoottinen, jos $F_{IS} = 1$ (Beebe & Rowe, 2008). F_{IS} p-arvoineen laskettiin Genetix -ohjelmalla (Belkhir ym., 2004).

2.8.3 Geenivirta

Populaatioiden välistä geenivirtaa tarkasteltiin GeneClass2 -ohjelmalla, joka pystyy erottamaan ensimmäisen polven immigrantit. Ohjelma pystyy määrittämään tai poissulkemaan yksilön lähdepopulaation tutkituista. Ohjelma laskee myös joka yksilölle todennäköisyyden kuulua jokaiseen tutkittuun populaatioon. Määritysten todennäköisyyttä testataan Monte Carlo menetelmällä (Piry ym., 2004). Ohjelman kohdennustestissä käytettiin vaihtoehtoa $L=L_{home}$, sillä osa mahdollisista lähdepopulaatioista puuttuu tarkastelusta kokonaan. Analyysiin ei otettu ollenkaan mukaan yksilöitä, joilla mikään lokus ei ollut monistunut. Tuloksia tarkastellessa mukaan otettiin ainoastaan yksilöt, joiden kohdennukseen oli pystytty käyttämään vähintään kuutta lokusta.

Genepop 4.2 -ohjelmaa (Raymond & Rousset, 1995) käytettiin myös geenivirran arvioimiseen. Ohjelma käyttää Slatkinin (Slatkin, 1995) privaattialleeleihin perustuvaa menetelmää, joka arvioi aineistolle efektiivisten immigranttien määrän. Lisäksi Arlequin-ohjelmalla laskettiin arvio efektiivisten migranttien määrästä F_{ST} -arvoja käyttäen.

2.8.4 Populaatiorakenne

Populaatiorakennetta testattiin Arlequin ja STRUCTURE (Pritchard ym., 2000) -ohjelmilla. Arlequinilla populaatioita voi yhdistellä ryhmiksi ja laskea F-arvoja. STRUCTURE:lle ei kerrota tunnettuja populaatiorajoja, vaan se itse laskee alleelifrekvenssien ja HW-tasapainon perusteella todennäköisyyden, montako geneettistä ryhmää aineistossa on ja mihin ryhmään mikäkin yksilö kuuluu ja missä määrin.

Arlequin-ohjelmalla suoritettiin molekyyliarianssianalyysi (AMOVA). Analyysi mittaa geenifrekvenssien varianssia ja sen jakautumista populaatioiden välillä ja sisällä. Siihen on mahdollista sisällyttää myös erilaisia populaatioiden ryhmittelyjä. AMOVA suoritettiin lokus lokukselta (locus by locus) ja permutaatiomääräksi valittiin 20 000.

Arlequin-ohjelmalla tehtiin Mantel-testi etäisyysisolaation olemassaolon selvittämiseksi. Testi tehdään verraten populaatioiden välisiä maantieteellisiä etäisyyksiä ja F_{ST} -arvoja. Mantel-testi kertoo kahden matriisin välisestä korrelaatiosta.

F_{ST} -arvo kertoo alapopulaation erilaistumisesta koko populaatioon nähden. Arvo lasketaan kaavalla: $F_{ST} = (H_t - H_s) / H_t$, jossa H_t on koko populaation odotettu heterotsygotia ja H_s alapopulaation odotetun heterotsygotian keskiarvo. F_{ST} eli fiksaatioindeksi on paljon käytetty alapopulaatioiden erilaistumisen mitta. Jos $F_{ST}=0$, populaatiorakennetta ei havaittu, mutta jos se on 1, ovat alapopulaatiot täysin eriytyneet. Arvoa 0,2 pidetään rajapyykkinä vahvalle populaatiorakenteelle (Beebe & Rowe, 2008). F_{ST} -arvot laskettiin Arlequin-ohjelmalla.

STRUCTURE-ohjelma käyttää ryhmittelyyn Bayesilaista tilastotiedettä. Ohjelma luokittelee yksilöt populaatioon arvioiden samanaikaisesti kullekin populaatiolle tyypillisiä geenifrekvenssejä. Menetelmä toimii useimmille geenimerkeille, myös mikrosatelliiteille. Oletuksena malleissa on, että populaatiot ovat Hardy-Weinberg- ja kytchentätasapainossa. Lokusten oletetaan myös olevan kytchentävapaita. Näin ohjelma voi olettaa kaiken poikkeaman näistä johtuvan populaation rakenteesta ja koittaa ryhmitellä yksilöitä siten, että populaatiot olisivat ainakin mahdollisimman lähellä Hardy-Weinberg- ja kytchentätasapainoa (Pritchard ym., 2000). Analyysi suoritettiin siten, että yksilöille sallittiin sekoittunut alkuperä, alleelifrekvenssimalliksi valittiin korreloitu malli ja populaatioiden määräksi (K) 1-15. Ajon pituudeksi valittiin 100 000 toistoa ja burn in pituudeksi 10 000 toistoa.

STRUCTURE:n antamia tuloksia jatkokäsiteltiin Evannon -menetelmällä, jossa todennäköisin K-arvo saadaan laskemalla ΔK -arvoja. STRUCTURE-ohjelman antamien todennäköisyyksien perusteella sopivan K-arvon löytäminen voi olla haastavaa ja täynnä virhetulkintamahdollisuuksia. Varmemmin

oikean K arvon löytää STRUCTUREn antamien perättäisten K-arvojen todennäköisyyksien muutoksien avulla laskettu ΔK :n avulla (Evanno ym., 2005).

2.8.5 Efektiivinen populaatiokoko

Efektiivisen populaatiokoon määrittäminen tehtiin ohjelmalla NeEstimator v. 2.1 (Do ym., 2014). Ohjelma laskee arviot efektiivisistä populaatiokoista mm. kytkentäepätasapainoon perustuvalla menetelmällä (Waples 2010) käyttäen kolmea raja-arvoa matalimmalle käytetyllä alleelifrekvenssille, sekä 95 % luottamusvälin ”linkkuveitsi”-menetelmällä (*jackknife-method*). Efektiivisen populaatiokoon ja havaitun populaatiokoon suhde laskettiin alleelifrekvenssien raja-arvolla 0,2.

2.8.6 Populaation pullonkaula

Populaation pullonkaulaa testattiin kahdella ohjelmalla ja kolmella tavalla. Arlequin laskee populaatioille Garza-Williamson -indeksin ja BOTTLENECK (Piry ym., 1999) käyttää mm. heterotsygotian ylimäärää populaation pullonkaulamenneisyyden selvittämiseen.

BOTTLENECK-ohjelma laskee heterotsygotian yli- tai alimäärää kussakin lokuksessa. Ohjelma käyttää kolmea mutaatiomallia simuloidakseen populaatioille mutaatio-ajautuminen-tasapainossa vallitsevan heterotsygotian ja vertaa sitä havaittuun. Käytetyt mallit ovat: IAM, SMM ja TPM. Näistä IAM (infinite allele model) sopii epäsäännöllisesti toistuville alleeleille, SMM (stepwise mutation model) säännöllisille ja TPM:n (two phase model) on sekoitus kahta edeltävää. Bottleneck käyttää kolmea tilastollista testiä testaamaan havaitaanko populaatiossa merkitsevässä määrässä lokuksia heterotsygotian ylimäärää. Näistä testeistä Wilcoxonin testi on voimakkain tämän tutkimuksen asetelmissa, sillä verrattavia polymorfisia lokuksia on alle 20. Ohjelma kertoo myös noudattavatko populaation alleelifrekvenssit tasapainotilassa havaittua L-käyrää (Piry ym., 1999). L-käyrän tarkastelu perustuu tasapainotilassa runsaina havaittavien harvinaisten alleelien määrän vähenemiseen pullonkaulan seurauksena. Käyrän tyyppi-arvo siirtyy harvinaisimmista alleeleista seuraavaan tai sitä seuraavaan luokkaan (mode shift). Tyyppi-arvon siirtymä on havaittavissa parisenkymmentä sukupolvea eteenpäin ja havaitsee alle 20 lisääntyvän yksilön pullonkaulan, kun käytetään 8-10 polymorfista mikrosatelliittilokusta (Luikart ym., 1998).

Garza-Williamson -indeksi lasketaan kaavalla $G-W=k/r$, jossa k on alleelien lukumäärä ja r alleelien koon vaihteluväli. Pullonkaulan myötä hävinneistä alleeleista jokainen pienentää k:n arvoa, mutta ainoastaan suurimman tai pienimmän alleelin katoaminen vähentää r:n arvoa. Täten mitä pienempi G-W -indeksi, sitä syvemmän pullonkaulan populaatio on käynyt (Garza & Williamson, 2001).

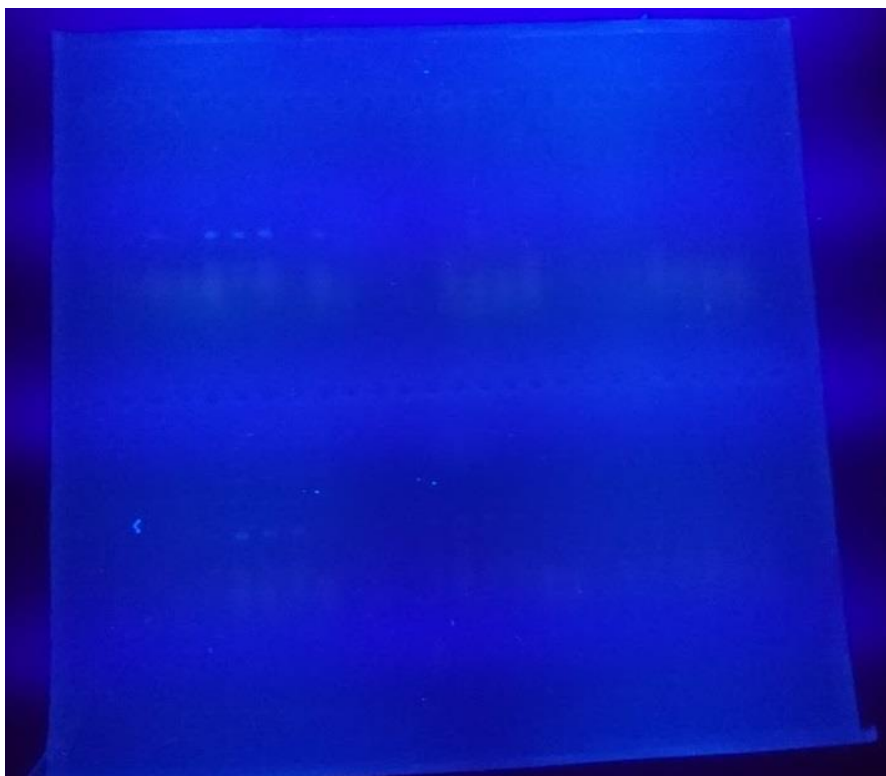
3 Tulokset

3.1 DNA:n eristyminen ja monistuminen

Taulukossa 3 on esitetty joka populaatiosta yksi Nanodrop -mittauksen tulos. Fenolien erotusliuoksen käyttäminen ei vaikuttanut eristeen laatuun, joten sen käyttöä ei jatkettu. Eristettyjen näytteiden DNA-pitoisuudet ja puhtaudet vaihtelivat ja geelillä näytteet olivat pääosin haaleita (kuva 21).

Taulukko 3 - Tuloksia Nanodrop -mittauksista

Näyte	ng/μl	260/280
H 15	18,25	1,08
Hae 1	123,18	1,12
Har 1	191,86	1,09
Hh 1	357,01	0,93
Ka 1	13,86	1,31
Kp 17	19,54	1,78
P 1	5,23	1,28
Py 1	7,72	1,59
Sa 1	14,59	1,61
T 1	8,87	0,69
V 1	40,04	1,3
Ven 1	43,37	1,22



Kuva 21 - Lehtopalsaminäytteitä geelillä

Arlequin kertoo lokuskohtaisesti puuttuvan tiedon osuudet (taulukko 4). Vähiten puuttuvaa tietoa on lokuksessa IGSSR 104 ja eniten lokuksessa IGSSR 203. Pyykösjärven populaation näytteistä yksi oli kadonnut matkalla. Siitä oli siis vain 29 näytettä.

Taulukko 4 - Puuttuvan tiedon osuus lokuksittain

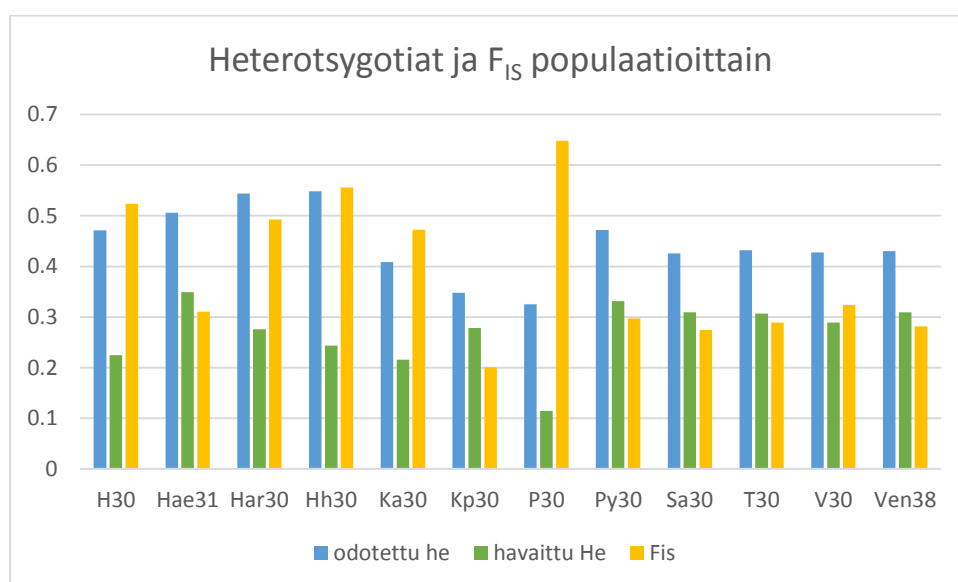
Puuttuvan tiedon osuus	
IGA 3	0,393162
IGSSR 106	0,632479
IGSSR 101	0,42735
IGSSR 104	0,019943
IGSSR 203	0,726496
IGA 21	0,518519
IGSSR 103	0,512821
IGSSR 210	0,42735
IGSSR 213	0,150997
IGSSR 240	0,321937

3.2 KytKentäepäTasapaino, Hardy-Weinberg -tasapaino ja nolla-alleelit

Lokuksesta IGSSR 210 löytyi nolla-alleelimahdollisuus kaikissa populaatioissa. Locus jätettiin pois laskettaessa F_{IS} -arvoja ja H-W -tasapainoja. Muiden lokusten kohdalla nolla-alleelien esiintymisen mahdollisuutta ei tukenut vähintään kaksi populaatiota. Kaikille populaatioille todennäköisyyksien laskeminen ei ollut mahdollista aineiston laadun vuoksi.

Genepop 4.2 -ohjelma löysi kytKentäepäTasapainoa kahden lokusparin väliltä kaikkien populaatioiden yli tarkasteltuna. Nämä lokusparit ovat: IGSSR103 & IGSSR213 ja IGSSR210 & IGSSR213. Populaatioitten sisäisissä tarkasteluissa kyseiset parit nousivat esille alle puolessa tai puolessa populaatioista.

Populaatiot poikkesivat merkitsevästi H-W -tasapainosta sekä yhtenä isona populaationa että erillisinä populaatioina ($P=0$) osoittaen heterotsygotian alimäärää (kuva 22). Lokuksittain tarkasteltaessa yhdestä (IGSSR 106) ei löytynyt merkitsevää heterotsygotian alimäärää ($P=0,3956$).



Kuva 22- Heterotsygotia- ja F_{IS} -arvot populaatioittain

3.3 Geneettinen muuntelu

Alleelimäärän perusteella muuntelevin locus oli IGA 3 (15 alleelia), vähiten muunteleva taas IGSSR 213 (2 alleelia). Alleelimäärien (taulukko 5) keskiarvoja tarkasteltaessa IGA 3 ja IGSSR 101 ovat tasoissa 5,33 keskimääräisellä alleelilla populaatiota kohden. IGSSR 213 oli vähiten muunteleva myös alleelikeskiarvon perusteella (1,917). Populaatioista eniten eri alleleja oli Hämyhetteellä, Karjasillalla, Kasvipuutarhalla ja Venkaalla kullakin keskimäärin 4,1 lokusta kohden. Populaatioiden

alleelimäärä on melko tasaista, lukuun ottamatta Pohjantien populaatiota, jolla on muihin verrattuna huomattavasti vähemmän alleeleja.

Taulukko 5 - alleelimäärät populaatioittain ja lokuksittain. Ka = keskiarvo

Alleelimäärä											
	IGA	IGNSSR	IGNSSR	IGNSSR	IGNSSR	IGA	IGNSSR	IGNSSR	IGNSSR	IGNSSR	Ka
	3	106	101	104	203	21	103	210	213	240	
Hietasaari	5	2	6	2	3	5	7	5	2	2	3,9
Hämyhete	6	3	5	8	3	1	2	8	2	3	4,1
Harjavalta	3	3	5	7	3	3	4	7	2	2	3,9
Hanganhete	5	4	5	7	3	2	3	6	2	2	3,9
Karjasilta	7	2	7	2	3	5	4	6	2	3	4,1
Kasvipuutarha	8	3	6	4	4	3	5	4	1	3	4,1
Pohjantie	3	1	3	3	0	1	2	2	2	2	1,9
Pyykösjärvi	5	2	4	3	4	5	5	6	2	3	3,9
Sauvojantie	6	3	4	3	3	4	3	3	2	4	3,5
Toppila	6	3	6	2	2	4	3	3	2	3	3,4
Välivainio	5	2	6	3	3	4	4	4	2	3	3,6
Vengas	5	3	7	5	2	4	4	6	2	3	4,1
ka	5,33	2,58	5,33	4,08	2,75	3,42	3,83	5	1,92	2,75	3,7
yhteensä	15	4	8	9	5	9	11	8	2	4	7,5

Alleelirikkaudet (taulukko 6) vaihtelevat lokusten välillä 1,701 (IGNSSR 213) ja 3,466 (IGNSSR 210) välillä. Lokusten alleelirikikkauksien keskiarvo on 2,45. Populaatioittain alleelirikikkauksien keskiarvot vaihtelivat 2,65 (Hanganhete) ja 2,1 (Kasvipuutarha) välillä. Kaikkien populaatioiden välinen keskiarvo oli 2,33.

Taulukko 6 - Alleelirikkaudet populaatioittain ja lokuksittain

	IGNSSR										
A	IGA 3	106	101	104	203	21	103	210	213	240	KA
Hietasaari	2,625	1,333	3,468	1,2	2,595	2,864	3,269	3,242	1,859	1,634	2,41
Hämyhete	3,101	1,753	3,082	2,905	1,6	1	1,375	4,086	1,954	2,112	2,3
Harjavalta	2,571	2,392	3,153	2,369	2,2	3	2,74	4,13	1,647	1,99	2,62
Hanganhete	2,978	3,035	3,493	3,353	3	1,375	2,491	3,587	1,281	1,871	2,65
Karjasilta	2,61	1,569	3,218	1,2	2,509	1,992	2,691	2,772	1,433	1,995	2,2
Kasvipuutarha	2,981	1,431	3,207	1,392	3,348	1,695	1,932	1,898	1	2,074	2,1

Pyykösjärvi	2,864	1,993	3,141	1,419	2,39	2,55	3,066	3,583	1,851	1,715	2,46
Sauvojantie	2,335	2,091	3,105	1,491	1,701	2,262	2,503	2,329	1,837	2,018	2,17
Toppila	2,407	2,485	3,487	1,198	1,802	2,355	2,338	2,495	1,813	2,05	2,24
Välivainio	2,285	1,273	3,317	1,898	2,299	1,766	2,505	2,866	1,669	2,314	2,22
Vengas	2,131	1,909	3,368	2,157	1,429	1,9	2,557	3,922	1,809	1,741	2,29
kaikki	2,705	2,025	3,351	1,896	2,22	2,196	2,8	3,466	1,701	2,092	2,45

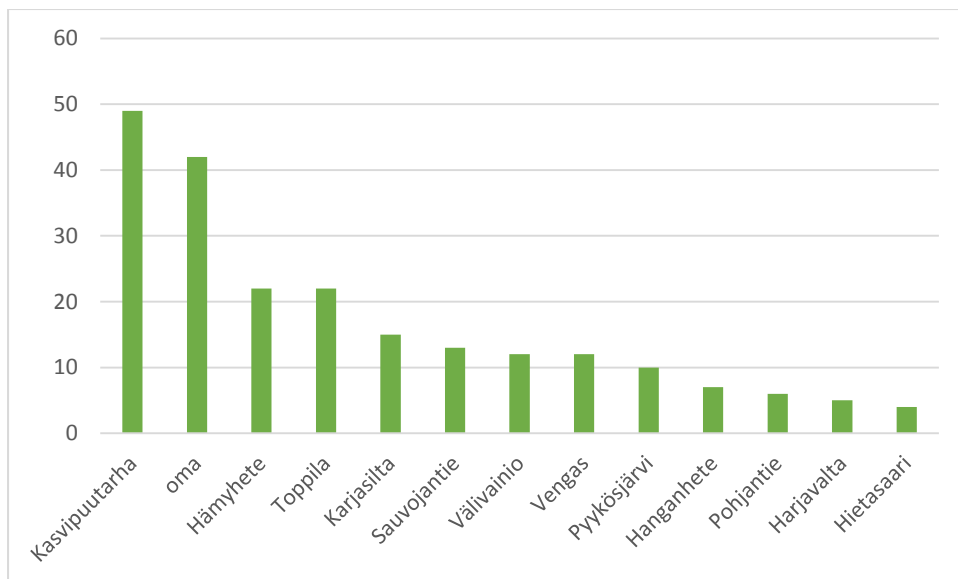
Suurin odotettu heterotsygotia (taulukko 6) on Harjavallan populaatiolla ($H_e=0,547$). Pienin taas löytyy Pohjantien populaatiosta ($H_e=0,324$). Lokuksittain odotettu heterotsygotia vaihtelee populaatioiden yli laskettuna 0,207 (IGNSSR 104) ja 0,741 (IGNSSR 101) välillä. Lokuksittain keskiarvo H_e vaihteli suunnilleen saman verran, mutta oli keskimäärin alhaisempaa. F_{IS} -arvot lokusten yli vaihtelivat 0,19 ja 0,602 välillä. Pienin arvo löytyy Kasvipuutarhan populaatiosta ja suurin Hanganhetteeltä. Keskiarvo on 0,37. Geneettisen muuntelun ja populaatioiden koon välillä ei havaittu merkittävää korrelaatiota. Korrelaatiokertoimeksi saatiin -0,154 ja p-arvoksi 0,65. Pieni positiivinen ei-merkitsevä korrelaatio (0,255, $p = 0,48$) oli havaittavissa jos Toppilan miljoonapopulaatio jätettiin pois.

Taulukko 6 - Odotetut heterotsygotiat

H _e	IGA 3	IGNSSR	IGNSSR	IGNSSR	IGNSSR	IGA	IGNSSR	IGNSSR	IGNSSR	IGNSSR	ka
		106	101	104	203	21	103	210	213	240	
Hietasaari	0,533	0,111	0,755	0,033	0,633	0,631	0,709	0,711	0,398	0,254	0,477
Hämyhete	0,632	0,255	0,668	0,458	0,195	0,000	0,125	0,832	0,480	0,453	0,410
Harjavalta	0,575	0,532	0,712	0,315	0,378	0,733	0,595	0,841	0,258	0,527	0,547
Hanganhete	0,593	0,658	0,774	0,558	0,800	0,125	0,621	0,756	0,097	0,395	0,538
Karjasilta	0,614	0,209	0,701	0,033	0,567	0,319	0,625	0,555	0,160	0,364	0,415
Kasvipuutarha	0,648	0,145	0,693	0,129	0,773	0,262	0,304	0,301	0,000	0,522	0,378
Pohjantie	0,833	0,000	0,800	0,086	0,000	0,000	0,303	0,533	0,328	0,356	0,324
Pyykösjärvi	0,617	0,533	0,725	0,071	0,463	0,510	0,692	0,778	0,391	0,257	0,504
Sauvojantie	0,386	0,411	0,715	0,068	0,246	0,445	0,605	0,570	0,381	0,371	0,420
Toppila	0,455	0,570	0,768	0,068	0,349	0,472	0,501	0,610	0,364	0,377	0,453
Välivainio	0,446	0,091	0,738	0,279	0,464	0,251	0,575	0,673	0,275	0,493	0,428
Vengas	0,361	0,325	0,710	0,234	0,143	0,284	0,562	0,825	0,359	0,256	0,406
ka	0,558	0,320	0,730	0,194	0,418	0,336	0,518	0,666	0,291	0,385	0,442
tot het	0,551	0,366	0,741	0,207	0,437	0,378	0,638	0,734	0,299	0,424	0,478

3.4 Geenivirta

Efektiiivisten immigranttien määräksi sukupolvessa saatiin privaattialleelimenetelmällä 3,00491 privaattialleelien frekvenssillä 0,0499807. Kohdennustestin mukaan noin 80 % (177/219) riittävällä lokusmäärällä kohdennetusta yksilöstä erosi genotyypiltään sijaintipopulaatiostaan. Suurin osa näistä yksilöistä sopi Kasvipuutarhan populaatioon (kuva 23). Toiseksi yleisimpiä olivat yksilöt, jotka kohdentuivat sijaintipopulaatioihinsa. M-matriisin arvot vaihtelivat 2,2:sta äärettömään. Geenivirta populaatioiden välillä on pääosin suurta (taulukko 7).



Kuva 23 - Kohdennustestin yksilöiden testin antamat todennäköisimmät lähdepopulaatiot

Taulukko 7. M-matriisi populaatioiden välisestä geenivirrasta

	Hietas.	Hämyh.	Harjav.	Hanganh.	Karjas.	Kasvip.	Pohjant.	Pyykösj.	Sauvoj.	Toppila	Välivain.
Hämyh.	∞	*									
Harjav.	∞	13,1	*								
Hanganh.	∞	4,8	7,2	*							
Karjas.	7,8	∞	∞	∞	*						
Kasvip.	3,4	6,8	∞	∞	8,8	*					
Pohjant.	∞	∞	∞	∞	∞	∞	*				
Pyykösj.	∞	∞	∞	∞	8,2	2,2	∞	*			
Sauvoj.	∞	∞	∞	∞	15,6	3,4	∞	61,1	*		
Toppila	∞	∞	∞	∞	6,7	2,2	∞	401	∞	*	
Välivain.	∞	∞	∞	∞	∞	11,2	∞	11,9	∞	25	*
Vengas	∞	703,9	21,8	11,8	∞	4,9	∞	∞	∞	∞	∞

3.5 Populaatiorakenne

Korrelaatiota geneettisen erilaistumisen ja maantieteellisen etäisyyden välillä ei havaittu Arlequin-ohjelman Mantel-testillä. Etäisyysislaatiota ei havaittu. Locus IGSSR 203 jäi AMOVA:sta pois liiallisen puuttuvan tiedon takia. Suurin osa muuntelusta sijoittui populaatioiden sisälle (taulukko 7). Vajaa kymmenes muuntelusta oli kuitenkin populaatioiden välillä ja F_{ST} -arvo 0,08403.

Taulukko 7 – AMOVA ilman ryhmäjakoa

Muuntelun lähde	Neliösumma	Varianssi	Varianssi %
Populaatioiden välillä	87,999	0,18386	8,4028
Populaatioiden sisällä	805,787	2,00419	91,5972
Kokonaisvaihtelu	893,787	2,18805	

FST: 0,08403, P = 0,000

Erilaisia ryhmäjakoa testatessa mielekkäin jaottelu oli Kasvipuutarhan populaation ottaminen erilleen muista (taulukko 8). Silloin ryhmien välinen varianssin osuus oli 8,65 ja F_{ST} nousi 0,14478:aan. Kun etäisyyksien tai populaatioiden etukäteistietoihin perustuvat ryhmät antoivat ryhmien väliseksi vaihtelun osuudeksi lähemmäs nollaa.

Taulukko 8 - AMOVA ryhmäjaolla

Muuntelun lähde	Neliösumma	Varianssi	Varianssi %
Ryhmien välillä	25,284	0,20282	8,65466
Populaatioiden välillä ryhmien sisällä	62,715	0,13647	5,8235
Populaatioiden sisällä	805,787	2,00419	85,52184
Kokonaisvaihtelu	893,787	2,34349	

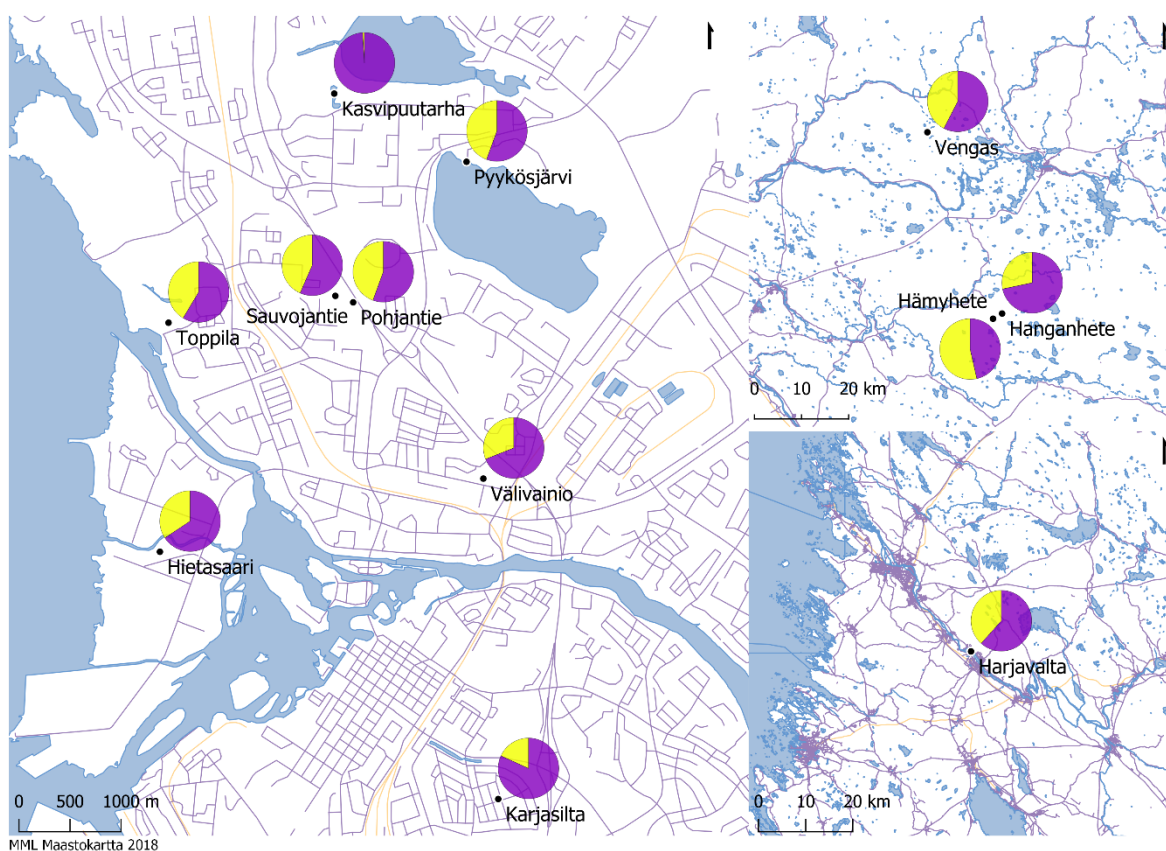
FST: 0,14478 P = 0,000

F_{ST} -arvojen perusteella populaatiot eivät juurikaan eroa toisistaan (taulukko 9). Arvot vaihtelivat 0 ja 0,18433 välillä (keskiarvo: 0,0216). Merkitsevien arvojen keskiarvo oli 0,0826. F_{ST} -arvoja yli 0,15 löytyi seuraavien populaatioiden väliltä: Kasvipuutarha-Pyykösjärvi (0,18302), Kasvipuutarha-Toppila (0,18433). Pientä eroa löytyi myös Kasvipuutarhan ja Sauvojantien (0,12673) ja Kasvipuutarhan ja Hietasaaren populaatioiden väliltä (0,12715). F_{ST} -arvot olivat Hanganhetteen ja Hämyhetteen sekä Kasvipuutarhan ja Venkaan populaatioiden välillä hieman yli 0,09. Mainitut arvot ovat merkitseviä.

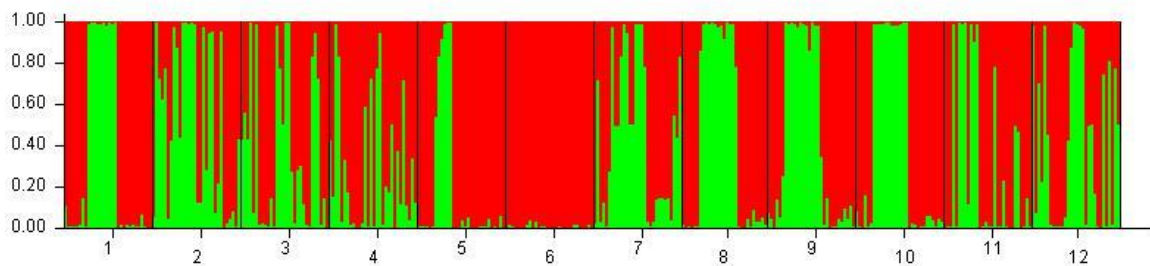
Taulukko 9 - Populaatioiden väliset FST-arvot (alla), p-arvoineen (yllä), merkittävät arvot ($p < 0,05$) tummennettu

	Hie	Häm	Har	Han	Kar	Kas	Poh	Pyy	Sau	Top	Väl	Ven
Hie	*	0,982	0,991	0,991	0,01802	0	0,99099	0,6036	0,97297	0,7297	0,982	0,97297
Häm	0	*	0,009	0	0,77477	0,01802	0,99099	0,96396	0,99099	0,991	0,991	0,46847
Har	0	0,0367	*	0	0,99099	0,99099	0,99099	0,99099	0,99099	0,991	0,991	0,22523
Han	0	0,0945	0,065	*	0,99099	0,99099	0,96396	0,99099	0,99099	0,991	0,991	0,02703
Kar	0,0605	0	0	0	*	0	0,99099	0,01802	0,03604	0	0,6757	0,6036
Kas	0,1272	0,0683	0	0	0,05389	*	0,99099	0	0	0	0,018	0
Poh	0	0	0	0	0	0	*	0,99099	0,99099	0,991	0,991	0,99099
Pyy	0	0	0	0	0,05778	0,18302	0	*	0,2973	0,4775	0,036	0,72072
Sau	0	0	0	0	0,03108	0,12673	0	0,00812	*	0,5856	0,8198	0,98198
Top	0	0	0	0	0,06911	0,18433	0	0,00125	0	*	0,1081	0,98198
Väl	0	0	0	0	0	0,04258	0	0,0402	0	0,0196	*	0,89189
Ven	0	0,0007	0,022	0,041	0	0,09295	0	0	0	0	0	*

Evannon -menetelmällä todennäköisimmäksi K-arvoksi saatiin 2. Kasvipuutarhan populaatio eroaa muista sisältäen lähinnä vain toista ryhmää (kuva 24, violetti; kuva 25, punainen). Karjasillassa saman ryhmän osuus on huomattavan suuri. Muissa populaatioissa on vähintään neljännes keltaista/vihreää ryhmää.



Kuva 24- STRUCTURE -ryhmittely kartalla



Kuva 25 - STRUCTURE -kuva, K=2, 1 Hietasaari, 2 Hämyhete, 3 Harjavalta, 4 Hanganhete, 5 Karjasilta, 6 Kasvipuutarha, 7 Pohjantie, 8 Pyykösjärvi, 9 Sauvojantie, 10 Toppila, 11 Välivainio, 12 Vengas

3.6 Efektiivinen populaatiokoko

Arviot efektiivisistä populaatiokoista luottamusväleineen on esitetty taulukossa 11. Korkeimmat N_e löytyivät Harjavallan ja Hanganheteen populaatioista (ääretön) ja matalin Pohjantieltä (1,1). Myös Kasvipuutarhalla ja Venkaalla oli korkeita arvoja. Efektiivisten populaatiokokojen keskiarvo ilman äärettömiä arvoja oli 17,5.

Taulukko 10 - Populaatioiden efektiiviset populaatiokoot 95 % luottamusväleineen (I), kolmea eri raja-alleelifrekvenssiä käyttäen

		Matalin käytetty alleelifrekvenssi		
		0,05	0,02	0,01
Hietasaari	N_e	2,6	5,4	5,7
	95 % Iv	1,5-8,8	1,8-28,1	2-25,2
Hämyhete	N_e	6,6	11,7	11,7
	95 % Iv	1,5-∞	1,7-∞	1,7-∞
Harjavalta	N_e	∞	∞	∞
	95 % Iv	1,1-∞	1,1-∞	1,1-∞
Hanganhete	N_e	∞	106,3	106,3
	95 % Iv	1,6-∞	1,7-∞	1,7-∞
Karjasilta	N_e	2,3	11,3	13,7
	95 % Iv	1,1-10,9	2,8-129,9	2,9-129,9
Kasvipuutarha	N_e	74,1	25,9	40,8
	95 % Iv	9,7-∞	6,1-∞	7,9-∞
Pohjantie	N_e	1,1	1,1	1,1
	95 % Iv	0,1-∞	0,1-∞	0,1-∞
Pyykösjärvi	N_e	2,1	2,5	2,5
	95 % Iv	1,1-7,6	1,5-7,6	1,5-8,3
Sauvojantie	N_e	3,1	8,2	8,6
	95 % Iv	1,4-20,2	2,2-59,7	2,3-63
Toppila	N_e	2,5	2,7	2,8
	95 % Iv	1,5-7,8	1,6-8,5	1,6-10
Välivainio	N_e	2,1	2,8	2,8
	95 % Iv	1,1-8,2	1,5-11,6	1,5-11,6
Vengas	N_e	15,9	37,4	37,4
	95 % Iv	1,9-∞	2,4-∞	2,4-∞

Efektiivisen populaatiokoon ja havaitun populaatiokoon suhteet populaatioille on esitetty taulukossa 12. Pienin arvo on Toppilan populaatiossa (0,0000027) ja suurin ääretön arvo löytyy Harjavalta. Toiseksi isoin arvo on Kasvipuutarhan populaatiossa: 0,59. Suhteiden keskiarvo oli 0,03.

Taulukko 11 - Efektiivisen populaatiokoon ja havaitun populaatiokoon välinen suhde (N_e/N)

Ne/N	
Hietasaari	0,00108
Hämyhete	0,0014625
Harjavalta	∞
Hanganhete	0,02126
Karjasilta	0,02825
Kasvipuutarha	0,259
Pohjantie	0,011
Pyykösjärvi	0,000025
Sauvojantie	0,0041
Toppila	0,0000027
Välivainio	0,00056
Vengas	0,00374

3.7 Populaation pullonkaula

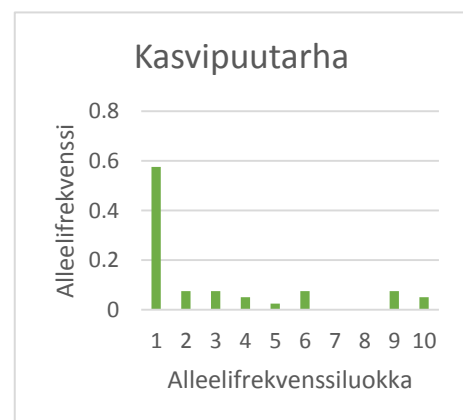
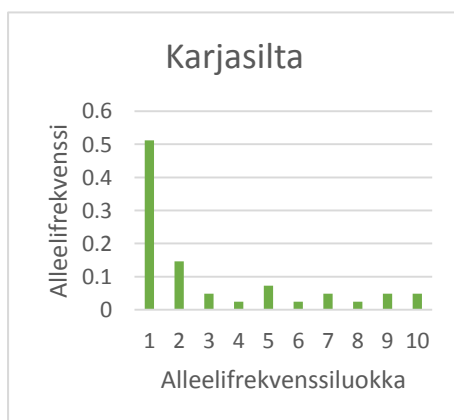
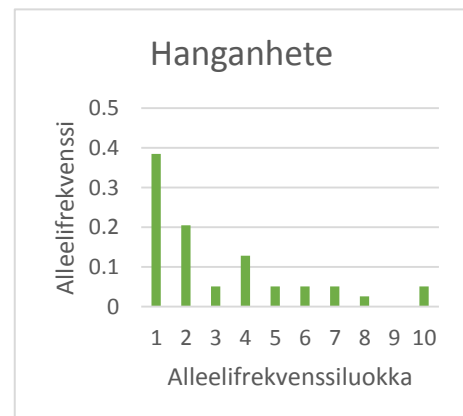
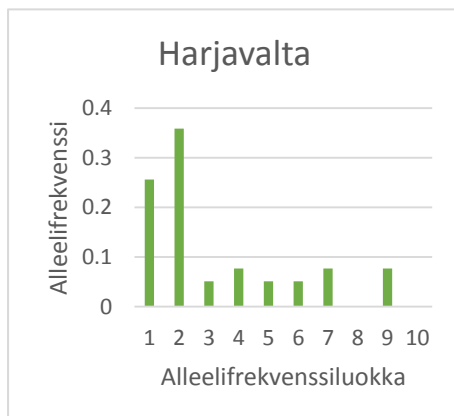
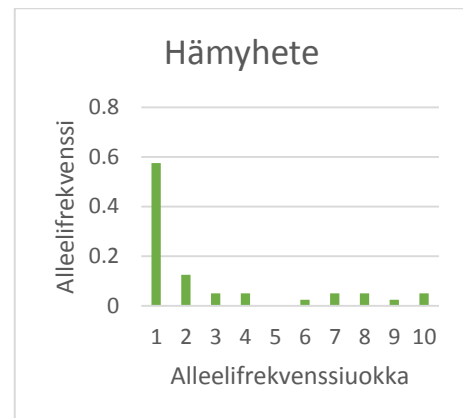
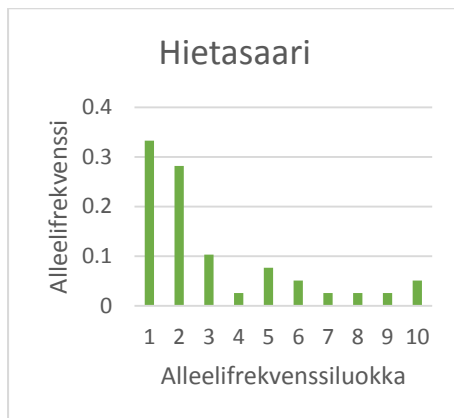
Pullonkaulatestien tulokset on esitetty taulukossa 13. Kaikkien populaatioiden keskiarvo Garza-Williamson -indeksistä on 0,27163 (keskihajonnalla 0,17722). Suurin arvo oli Hämyhетен populaatiolla (0,28388) ja pienin Pohjantiellä (0,14010).

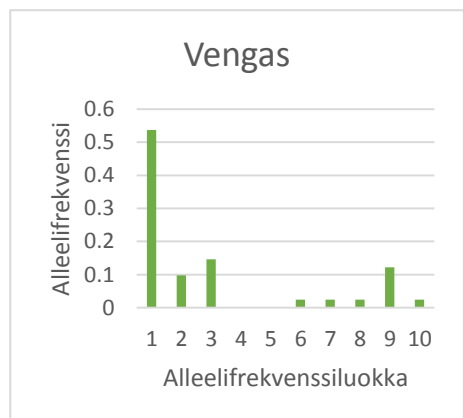
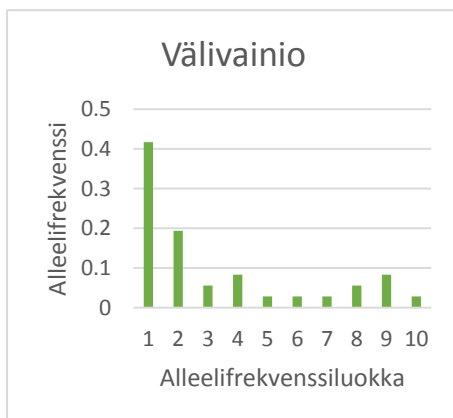
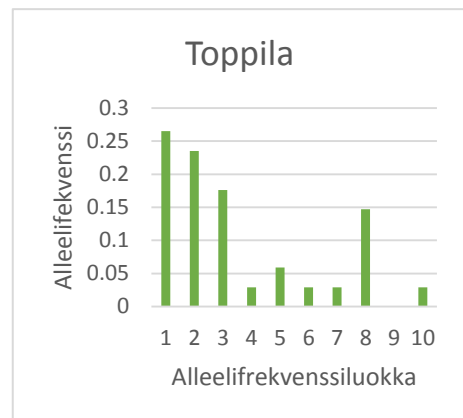
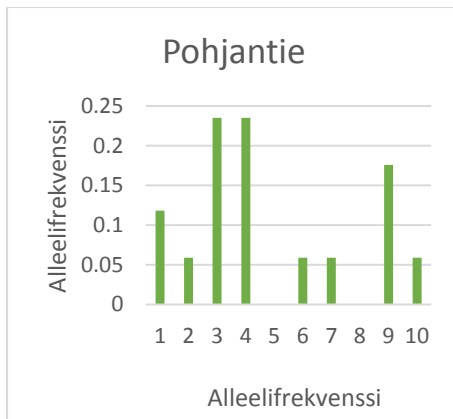
Bottleneck-ohjelman tuloksissa tyyppiäsiirtymä havaittiin kahdella populaatiolla: Harjavalta ja Pohjantie (kuva 26). Wilcoxon testi havaitsi merkitsevän heterotsygotian vajeen TPM -ja SMM -malleilla viidessä populaatiossa: Hämyhete, Karjasilta, Kasvipuutarha, Vengas ja Välivainio. Pohjantien populaatiosta oli liian vähän tietoa Wilcoxon -testin laskemiseen, joten se jätettiin aineistosta pois tätä testiä varten.

Taulukko 12 - Pullonkaulatestien tulokset. G-W = Garza-Williamson -indeksi, Wilcoxon = heterotsygotian ylimäärän p-arvo, frekvenssiluokan tyyppiäsiirtymä

populaatio	G-W	Wilcoxon	tyyppiäsiirtymä
Hietasaari	0,22564	0,6875	
Hämyhete	0,26461	0,17969	
Harjavalta	0,25483	0,8125	x

Hanganhete	0,25515	0,34766
Karjasilta	0,23243	0,16113
Kasvipuutarha	0,24416	0,10156
Pohjantie	0,1426	- x
Pyykösjärvi	0,22299	0,83887
Sauvojantie	0,22248	0,42285
Toppila	0,21343	0,8623
Välivainio	0,22758	0,24609
Vengas	0,26359	0,05273





Kuva 26 - Alleelifrekvenssiluokkien tyyppiarvon siirtymät populaatioittain

4 Pohdinta

Populaatioiden monimuotoisuus ei korreloinut maantieteellisen sijoittumisen, eikä populaatioiden koon mukaan. Kaikilla populaatioilla ilmeni pullonkauloja G-W -indeksin mukaan, mutta vain harvalla ilmeni niitä muilla menetelmillä. Populaatiot ovat kaiken kaikkiaan melko homogeenisiä ja niistä erottuvat lähinnä Kasvipuutarhan populaatio ja Karjasillan populaatio. Kasvipuutarhan populaatiosta puuttuu piirteitä, joita kaikissa muissa populaatioissa on. Toisaalta kaikissa muissa populaatioissa on Kasvipuutarhan populaatiolle ominaisia piirteitä. Hanganhete ja Hämyhete ovat geneettisesti erilaistuneita toisistaan läheisestä sijainnista ja yhteisestä eristyneisyydestä huolimatta. Kasvipuutarha oli vähiten muunteleva, mutta sen F_{IS} -arvo oli matala, eli sillä ei todennäköisesti esiinny niin paljoa sukusiitosta kuin muilla populaatioilla. Pohjantien populaatiosta puuttui paljon tietoa. Eniten muuntelevia olivat eristynyt Hanganhete ja lajin yhtenäiseen levinneisyysalueeseen sijoittuva Harjavalta.

4.1 Monimuotoisuus, F_{IS} ja efektiivinen populaatiokoko

Alleelirikkaus kertoo pelkkää alleelimäärää paremmin populaatioiden välisestä vaihtelusta, sillä se ottaa huomioon otoskoon ja on täten vertailukelpoinen. Vaikka yksilömääräiset otoskoot ovatkin samoja (yhtä puuttuvaa yksilöä lukuun ottamatta), lokusten monistumisessa oli valtavia eroja eri populaatioiden välillä. Alleelimäärät otettiin kuitenkin esille, jotta Pohjantien populaatiokin saadaan mukaan. Pohjantien populaatio olikin vähiten muunteleva kaikilla sille toimivilla mittareilla: alleelimäärällä, odotetulla ja havaitulla heterotsygotialla. Pohjantien F_{IS} -arvo oli myös korkein, eli sillä todennäköisesti esiintyy eniten sukusiitosta. Oletettavasti sekä pienen populaatiokoon että umpipölytteisten kukkien korkean osuuden johdosta.

Eri populaatioiden alleelirikkaudet olivat melko tasaisia. Mielenkiintoisesti Kasvipuutarhan populaation alleelirikkaus oli matalin, vaikka populaation tiedetään saaneen geneettistä materiaalia hyvin monipuolisista lähteistä. Alleelirikkaudet eivät myöskään korreloineet populaatioiden kokojen kanssa. Tämä voi viitata perustajavaikutukseen, tai olla lajin ekologiaan liitännäinen. Lehtopalsami pystyy lisääntymään ja valtaamaan nopeasti erilaisten häiriöiden vapauttaman pinta-alan, kuten Toppilan miljoonapopulaatio on osoittanut. Hienoinen positiivinen korrelaatio populaation koon ja alleelirikkauksien välillä löytyy, jos Toppilan miljoonapopulaatio jätetään tarkastelussa pois. Kaikki merkit viittaavat Toppilan populaation kokeneen räjähdysmäisen yksilömäärän kasvun ihmistoiminnan aiheuttaman habitaatin muokkauksen johdosta. Muut populaatiot ovat pysyneet kooltaan tasaisempina ja kasvupaikaltaan vakaampina.

Odotetun heterotsygotian perusteella muuntelevin oli Harjavallan populaatio. Harjavalta kuuluu lehtopalsamin yhtenäiseen levinneisyysalueeseen. Odotetut heterotsygotiat olivat kaikkiaan

lehtopalsamilla melko korkeita, keskiarvo oli 0,445. Havaitut heterotsygotiat olivat melkoisesti pienempiä, keskiarvona 0,271. F_{IS} -arvot olivat siis suuria (keskiarvo: 0,37). Samaa sukua oleva, mutta erittäin invasiivisena Euroopassa tunnetun jättipalsamin heterotsygotia-arvot olivat paljon pienempiä Oulussa. Jättipalsamin H_e keskiarvo oli 0,236 ja $H_o = 0,208$. Jättipalsamilla heterotsygotioiden erot olivat pienet, joten F_{IS} -arvotkin olivat pienet. Lajien suuret F_{IS} arvojen poikkeamat selittyvät niiden erilaisilla lisääntymisstrategioilla ja jättipalsamin invaasiolaji -statuksella. Jättipalsamin ei tiedetä tekevän itsepölytteisiä kukkia (Höyhtyä, 2019). Helsinkiläisten jättipalsamin heterotsygotiat noudattivat oululaisten lajitoveriansa kanssa samankaltaista linjaa. Niillä tosin F_{IS} -keskiarvo oli negatiivinen odotettua korkeamman heterotsygotian takia (Marton, 2011). Polymorfisten lokusten määrä oli myös alhaisempi jättipalsamilla (5,9 vs. 8,4) (Höyhtyä, 2019). Lehtopalsamin heterotsygotioiden arvot muistuttavat jättipalsamin vastaavia arvoja lajin alkuperäisellä esiintymisalueella Intiassa ja Pakistanissa (H_e ka. = 0,64; H_o ka = 0,29 ja F_{IS} ka = 0,54) (Marton, 2011)

Lehtopalsamin korkeiden positiivisten F_{IS} -arvojen taustalla ovat todennäköisesti lajin vaihtelevin astein itsepölytteinen lisääntymistapa ja pienet populaatiokoot. Risti- ja itsepölytyksen suhteet vaihtelevat populaatioittain olosuhteiden perusteella. Hyönteispölytys tapahtuu todennäköisimmin lähikasvien kesken, eivätkä siemenet useimminkaan liiku räjäytysmekanismista huolimatta kauas emokasvista (Hatcher, 2003). Pienet populaatiokoot ovat omiaan sukusiitoksen edistämisessä, mikä taas nostaa F_{IS} -arvoja (Frankham ym., 2004).

Korkein F_{IS} löytyi Hanganhetteeltä (0,602). Populaation tiedetään tehneen ristipölytteisiä kukkia nelisen vuotta ennen aineiston keruuta. Arvo on kuitenkin suuri. Pelkkä ristipölytteisten kukkien tuottaminen ei toisaalta takaa onnistunutta pölytystä. Kenties pölyttäjät eivät löydä paikkaa, tai aineiston keruuta edeltäneet vuodet eivät ole olleet yhtä suotuisia ja kasvit turvautuivat enemmän umpipölytteisiin kukkiin. Lehtopalsami on arka loppukesän halloille (Hatcher ym., 2004). Näin lähellä levinneisyysalueen rajaa, on lämmönvaihtelu voinut olla epäsuotuisaa, toisaalta lähteen vaikutus tasaa ympäristön pienilmastoa. Yhteydet muihin populaatioihin ovat huonot. Hanganhetteen lähellä on vain yksi toinen lehtopalsamipopulaatio - Hämyhete. Populaatioiden välillä ei ole montaa kilometriä, mutta Hanganhetettä kiertää hakkuuaukio juuri samasta suunnasta, jossa Hämyhete olisi vain muutaman kilometrin päässä.

Suuria F_{IS} arvoja löytyy myös Harjavallasta (0,554) ja Pohjantieltä (0,584). Pohjantien pelkkä pieni koko ja puutteelliset tiedot ovat omiaan luomaan suuri F_{IS} -arvoja, mutta Harjavaltaa on vaikeampi selittää. Aineiston matalin F_{IS} -arvo löytyi Kasvipuutarhan populaatiosta. Ehkä usean lähdepopulaation mahdollisesti joskus aiheuttama Wahlundin efekti on jo purkautunut, tai tämä

populaatio on pullonkaulojen kautta karistanut jäljet useasta lähdepopulaatiosta pois. Kasvipuutarhan populaatio on melko pieni - vain noin 100 yksilöä. Populaatio vaikutti olevan myös muiden kostean lehdon asukkien varjostama ja miltei tukahduttama. Näiden seikkojen olisi toisaalta odottanut johtavan korkeaan F_{IS} -arvoon. Puutarhan hoitotyöt, ruohon leikkuu ja polkujen avoinna pitäminen kuitenkin ilmeisesti takaavat lehtopalsamille riittävän häiriön paikalla menestymiseen. Pölyttäjäistä ei pitäisi kasvitieteellisellä puutarhalla olla pulaa. Ehkä kasvit jäävät varjostuksessa pieniksi eivätkä tee montaa kukkaa, joten itsepölytys jää pieneksi.

Efektiiviset populaatiokoot olivat hyvinkin pieniä. Toppilan populaation melkein olematon N_e/N -suhde heijastelee populaation aiempaa populaatiokokoa ennen sen kokemaa suurta kasvua. Kaikkien paitsi Kasvipuutarhan populaatioiden N_e/N suhde oli huomattavasti yleisesti lajeilla havaittua kymmenesosaa pienempi. Pienet efektiiviset populaatiokoot vähentävät huomattavasti populaatioiden evoluutiopotentiaalia.

4.2 Populaation pullonkaula

Pullonkaulatestit antoivat toisistaan poikkeavia tuloksia. Tähän syynä testien erilaisuus. Garza-Williamsonin menetelmän vahvuus on tunnistaa kauankin aikaa sitten tapahtuneen kauemmin kestäneen pullonkaulan – vaikka palautumista olisi jo ehtinyt tapahtua. BOTTLENECK -ohjelman menetelmät taas ovat parempia tunnistamaan hiljattain tapahtuneen pienemmänkin pullonkaulan. Populaation voidaan siis olettaa käyneen läpi rankankin pullonkaulan kauan aikaa sitten ja kenties jo palautuneen jonkin verran, jos G-W -indeksi on matala, mutta heterotsygotia ei näytä merkkejä ylimäärästä tai alleelifrekvenssien tyyppiä ei ole muuttunut. Jos taas heterotsygotian ylimäärä tai tyyppiä viittaa pullonkaulaan, mutta G-W -indeksi ei, on populaation läpikäymä pullonkaula todennäköisesti uudempi ja lievempi (Williamson-Natesan, 2005).

G-W -indeksi (0,1-0,28) oli kaikilla populaatioilla huomattavasti alle 0,7, jonka alittavia arvoja pidetään merkinä pullonkaulaan (Garza & Williamson, 2001). Pullonkaulaan viittaavat G-W-arvot voivat viitata perustajavaikutukseen, kun laji on päätenyt joko ihmisen avittamana tai ilman, uudelle asuinsijalle. Lehtopalsamille tyypillinen hyvinkin vaihteleva populaatiokoko on myös omiaan luomaan pullonkauloja. Huonompana vuonna populaatiosta ei moni yksilö pääse siementämään. Suotuisampana aikana sopivan häiriön jälkeen laji voi suorastaan räjähtää käsistä, kuten Toppilan populaatiossa oli tapahtunut.

Lähihistoriassa tapahtuneeseen pullonkaulaan viittaava alleelifrekvenssiluokan tyyppiä siirtymä löytyi kahdesta populaatiosta: Harjavalta ja Pohjantie. Pohjantien populaation tiedetään olleen aineiston keruuvuotta aikaisempaan vuonna alle 10 yksilöä. Aineiston keruuvuonna yksilöitä oli jo vajaa 100. Populaation tiedetään olleen paikalla noin parikymmentä vuotta. Tuoreempi pullonkaula

voi olla vielä perustajavaikutuksesta johtuvaa, tai populaation koon lasku on voinut aiheutua myös ympäristön umpeenkasvun tai kuivuuden johdosta ja lähteä nousuun häiriön tai edullisempien kosteusolojen myötä. Myös tekijöiden yhteisvaikutukset ovat mahdollisia. Populaatio sijaitsee epätavallisesti kuivahkossa mäntymetsässä. Harjavallan alleelifrekvenssien tyyppiä siirtymälle on vaikeampi löytää syytä. Siirtymä ei ole yhtä selkeä kuin Pohjantien populaatiossa, mutta on selkeästi havaittavissa. Populaatio sijaitsee vakaassa ja pitkään tunnetussa kasvuympäristössä, jossa lehtopalsamin kanssa elintilasta kilpailee alueelle puutarhoista levinnyt jättipalsami. Jättipalsamia on kitketty paikalta aineiston keruuvuotta edeltäneinä kesinä. Kenties jättipalsami on aiheuttanut populaatiokokoon notkahduksen?

4.3 Populaatorakenne ja geenivirta

Populaatioiden väliset F_{ST} -arvot olivat suureksi osaksi lähellä nollaa. Merkitsevistä arvoista suuri osa oli Kasvipuutarhan populaation ja muiden populaatioiden välillä. Karjasilta oli toinen populaatio, jolla oli paljon merkitsevää erilaistumista muiden populaatioiden kanssa. Pohjantie ei eronnut yhdestäkään populaatiosta, kenties koska siitä ei ollut tarpeeksi tietoa saatavilla erotukseen.

Etäisyysisolaation puuttuminen tukee oletusta, että ihminen on siirrellyt kasvia ympäriinsä. Toisaalta liettualaisilla ja tsekkiläisillä palsameilla on havaittu voimakkaampaa etäisyysisolaatiota juuri invasiivisilla palsamilajeilla (*I. glandulifera* ja *I. palliflora*), kuin alueella pitkään kasvaneella lehtopalsamilla (Kupcinskiene ym., 2015). Syyksi epäiltiin lehtopalsamin tasaisempilaatuisia kasvuympäristöjä.

Kasvipuutarhan populaatio erottui joukosta monella tavalla. Sen ajateltiin olevan mahdollinen lähdepopulaatio muille kaupungin alueella oleville populaatioille, etenkin Toppilan populaatiolle, jonne on kasvipuutarhalla siirretty maata. Näin ei näyttäisi olevan, ainakaan se ei ole ainoa lähdepopulaatio millekään muulle tutkitulle populaatiolle, tai tapahtumasta on niin paljon aikaa, että populaatiot ovat päässet eriytymään. F_{ST} -arvojen mukaan Kasvipuutarhan populaatio eroaa melkein kaikista muista huomattavasti. Ne, joiden kanssa merkittävää eroa ei ole, ovat STRUCTURE-tulostenkin mukaan samankaltaisimpia (pois lukien Pohjantie). STRUCTURE -analyysin perusteella Kasvipuutarhan populaatiosta näyttää puuttuvan aineksia, joita aivan kaikissa muissa populaatioissa on. Kuitenkin kohdennustestin kohdennetuista yksilöistä suurin osa kohdentui juuri Kasvipuutarhan populaatioon ja geenivirta sen ja satojen kilometrien päässä sijaitsevan Harjavallan populaation välillä oli ääretöntä. Tämä ei ole mahdollista ja korkea laskennallinen geenivirtaa kertoo ennenkin populaatioiden/yksilöiden geneettisestä samankaltaisuudesta. Todennäköisesti samankaltaisuus tulee siitä, että alukkeiden huonon toimivuuden aiheuttama korkea tiedonpuute monien lokusten ja populaatioiden kohdalla ei tuo tarpeeksi tietoa yksilöiden tai populaatioiden

erittelyyn toisistaan. Kasvipuutarhan selkeä erottuminen voisi johtua sen historiasta. Oulun yliopiston kasvitieteelliselle puutarhalle tiedetään siirretyn lehtopalsamia useasta eri paikasta ja useasta eri maasta. Osa siirretyistä populaatioista on puutarhalta hävinnyt, mutta niistä on todennäköisesti jäänyt geneettisiä jälkiä paikalla selvinneisiin yksilöihin. On myös mahdollista, että kasvipuutarhan populaatiosta ovat hävinneet toiselle STRUCTURE -ryhmittymällä ominaiset yksilöt. Populaatio on pieni ja siten altis esimerkiksi ajautumiselle.

4.4 Keskus- ja reunapopulaatiot

Tutkimuspopulaatioista Harjavallan populaatio edustaa keskuspopulaatiota. Loput populaatiot sijoittuvat epäyhtenäisen laikuittaisen levinneisyyden piiriin. Näistä Oulun kaupungin populaatiot ovat kohtalaisen hyvin kytköksissä toisiinsa. Viinivaaran lähteiden populaatiot (Hanganhete ja Hämyhete) ovat eristyksissä kaikista muista populaatioista, mutta lähellä toisiaan. Venkaan populaatio on yksin kaukana kaikista muista populaatioista.

Hangan- ja Hämyhetteen populaatioiden välinen merkittävä erilaistuminen ($F_{ST} = 0,0945$, $p = 0$) sopii reunapopulaatioilla havaittuun populaatioiden välisen erilaistumisen nousuun verrattuna keskuspopulaatioihin (Eckert ym., 2008). Populaatioiden välinen geenivirta on verrattain pientä maantieteellisestä läheisyydestä huolimatta. Niiden välinen arvioitu geenivirta oli tulosten pienimmästä päästä (4,8; vaihteluvälillä 2,2 - ∞) ja kohdennustestissä vain yksi Hämyhetteeltä peräisin oleva yksilö kohdentui Hanganhetteelle. Etäisyysisolaatiota ei kuitenkaan koko aineistossa havaittu.

Populaation sisäisen monimuotoisuuden odotetaan laskevan keskuspopulaatioista reunapopulaatioihin siirryttäessä. Aineiston korkein geenidiversiteetti (0,547) löytyikin keskuspopulaatiota edustavasta Harjavallasta. Toiseksi korkein taas löytyi reunapopulaatio Hanganhetteeltä (0,538).

Oulun lehtopalsamipopulaatioiden luonnontilaisuutta on vaikea arvioida tämän työn valossa. Lähdepopulaatioksi ajatellusta Kasvipuutarhan populaatiosta on jäljellä niin vähän yksilöitä, että se on voinut ajautua kauaskin siitä, millainen se oli, kun muut populaatiot (esim. Toppila) siitä kenties erosivat. Jo populaatioiden sijoittuminen tarkasti ihmisen muokkaamaan kaupunkiin viittaisi sen olevan alueella ihmisen toimesta. Toisaalta kaupunkialueella lajille kriittinen siementen kypsymsajankohdan lämpötila on ympäröiviä alueita tasaisempia ja ihmistoiminta tuo lajin kaipaamaa häiriötä. Lehtopalsamille soveltuvia habitaatteja ei ole tässä työssä kartoitettu. Lajihavainnot tapaavat painottua havainnoitsijoiden luo. Oulusta on kuitenkin tehty kattava kasvillisuuskartoitus, jossa palsamit olisivat mitä todennäköisimmin löytyneet, jos niitä muualla silloisella Oulun alueella olisi esiintynyt (Väre ym., 2005).

4.5 Aineiston luotettavuus

Kasvinäytteet kerättiin kesä-, heinä- ja elokuussa, jokainen populaatio hieman eri aikaan. Kaupungin populaatioiden näytteet kerättiin suunnilleen samaan aikaan kesä-heinäkuiden vaihteessa, mutta Venkaan ja Viinivaaran populaatioista näytteet kerättiin vasta elokuun lopulla. Kasvipuutarhan populaatio jopa kahtena ajankohtana. Tämä ei ole optimaalista, sillä kasvipopulaation vanhetessa sen geneettinen koostumus voi muuttua. Tämä näkyy erityisesti F_{IS} -arvoissa, jotka voivat muuttua lähemmäs H-W -tasapainoa huomattavasti kelpoisten homotsygoottien kuollessa pois. Luotettavan F_{IS} -kertoimen saamiseksi näytteet olisi hyvä ottaa nuorista versoista, tai populaatioiden väliseen luotettavaan vertailuun vähintäänkin saman ikäisistä kasveista (Silvertown & Charlesworth, 2001). Muiden *Impatiens* -lajien on kirjattu olevan itseharventuvia (Čuda ym., 2014). Lehtopalsamilla todennäköisesti käy samoin, mikä entisestään korostaa populaation geneettisen koostumuksen muuttumista kasvukauden edetessä. Sauvolantien populaatiossa itseharvenemista onkin havaittu (Annamari Markkola, suullinen tiedonanto).

Käytetyt alukkeet oli suunniteltu jättipalsamille ja ne toimivatkin sillä paremmin (Höyhty, 2019; Marton, 2011). Geenikopioiden määrä oli oululaisille jättipalsamilla aina 60 (Höyhty, 2019), lehtopalsamilla ka 58,5. Lehtopalsamilla puuttui monen lokuksen kohdalla tietoja yli puolet. Puuttuvia tietoja on paljon ja tämä heikentää analyysien merkitsevyyttä ja estää puutteellisimpien yksilöiden ja populaatioiden käytön osasta analyyseissä. On mahdollista, että laboratoriovaiheissa on sattunut virheitä ja kontaminaatiota vaatimattoman laboratoriotyöskentelykokemukseni johdosta.

Jättipalsameille Helsingissä suoritettussa vastaavassa tutkimuksessa (Marton, 2011) markkerien käyttäytymisessä oli eroja ja yhtäläisyyksiä verrattuna lehtopalsamiin. IGA 2 ei monistunut kummassakaan tutkimuksessa. IGA 3 oli molemmissa informatiivisimpia. Jättipalsameilla informatiivisimpiin lokuksiin kuului myös IGSSR 203, joka lehtopalsamilla oli epäinformatiivisimmasta päästä alleelimäärien suhteen (ja siitä oli eniten puuttuvaa tietoa). Lehtopalsamilla hyvin informatiiviseksi taas osoittautui IGSSR 103, joka oli yksi vähiten vaihtelevimmista jättipalsamilla yhdessä IGSSR 101 kanssa, joka taas oli lehtopalsamilla yksi eniten havaittuja alleeleja per populaatio omannut lokus.

Pohjantien populaation tulokset olivat muita populaatioita huomattavasti heikompia. Eristyksessä on voinut olla puutteita tai sattua virheitä. Näytteet ovat voineet esimerkiksi olla lämpimässä liian kauan. Pohjantien populaation eristykseen käytettiin vanhempaa eristyskittiä ja ensimmäisiä näytteitä ei hienonnettu huuhkareella, kuten myöhemmille tehtiin, vaan ne silputtiin pieneksi skalpellilla. Samaa vanhempaa eristyskittiä käytettiin myös osaan Hietasaaren näytteistä, joiden käsittely onnistui hyvin. Populaation kasvupaikka on lajille epätyypillinen kuivahko mäntymetsä, joka on

voinut saada kasvin tuottamaan DNA:n eristystä tai monistusta haittaavia yhdisteitä (Schrader ym., 2012). Paikka vilkkaasti liikennöidyn tien vierellä on voinut tuoda kasveihin myös käsittelyä vaikeuttavia ja DNA:ta heikentäviä aineita, mm. raskasmetalleja (Gichner ym., 2006).

4.6 Ehdotuksia jatkotutkimukseen

Suomessa lehtopalsami on etelässäkin levinneisyysalueensa reunalla maantieteellisesti, lisäksi täällä jääkauden vaikutus on voimakasta (Eckert ym., 2008). Lisätutkimusta tarvitaan laajemmalla aineistolla, jota voitaisiin verrata muihin samantyyliisiin saman alueen kasveihin. Keskuspopulaatioiden edustusta olisi hyvä nostaa tähän työhön verrattuna.

Kasvinäytteet tulisi kerätä yhtenäisen ajankohtana. Tämän tulisi tapahtua mieluiten kukkimisaikaan, jolloin erityyppisten kukkien osuuksia voi laskea. Toisaalta F_{IS} -arvoa ajatellen paras aineistonkeruujankohda olisi mahdollisimman aikaisin ennen itseharvennusta. Populaatioiden ympäristöstä on hyvä kerätä erilaista tietoa, kuten valoisuuden ja kosteuden määrä. Muuttujat, joiden mittaamisessa voi tulla eroja henkilöiden välillä, olisi hyvä suorittaa yhden henkilön toimesta, tai ainakin mahdollisimman standardoidusti.

Tutkimuspopulaatioita valitessa olisi hyvä olla kaikki mahdollinen taustatieto populaatioista, jotta tutkimukseen mukaan tulevat populaatiot olisivat mahdollisimman paljon tavoitteiden mukaiset. lehtopalsamille sopivia habitaatteja voisi mallintaa ja verrata niitä alueella esiintyviin populaatioihin ja niiden leviämiskykyyn ja reitteihin. Aikaisen sukkession lajeilla siementen hyvän leviämiskyvyn ja muutamaa vuotta pitempään säilyvän seimenpankin voisi olettaa olevan tärkeitä ominaisuuksia. Nykytiedon valossa lehtopalsamin siementen leviäminen ei ole kovinkaan tehokasta, paitsi kenties vesistöjen äärellä. Lajin siemenpankki on myös hyvin lyhytikäinen (Hatcher, 2003). Lisätutkimus lehtopalsamin leviämistavoista ja siemenpankista voisi tuoda sen suojelulle merkittävää tietoa.

Jättipalsamille kehitetyt alukkeet toimivat tässä työssä lehtopalsamilla kehnosti. Puuttuvan tiedon osuus oli lokuksilla korkea: keskimäärin 40 %. Alukkeiden toimintaa lehtopalsamilla voisi vielä tutkia ja jatkuvan huonon menestyksen jälkeen kehittää omia.

4.7 Lajin tulevaisuus alueella

Lehtopalsamin levinneisyyttä alueella rajoittaa luultavasti siementen kypsymisajan kylmyys. Laji on Pohjois-Pohjanmaalla levinneisyytensä rajoilla löytänyt muutamia habitaatteja, joissa se pystyy muodostamaan selviytymiskykyisiä populaatioita. Lähteillä ja kaupungeissa mikroilmasto on ympäröiviä alueita tasaisempaa.

Lehtopalsamin häiriöstä hyötyminen antaa sille mahdollisuuden hyötyä globaali muutoksen tuomista maankäyttömuutoksista. Ihminen muokkaa ympäristöään tehokkaasti ja jatkuvasti, luoden samalla

sopivia elintiloja lehtopalsamille, vaikka ne olisivatkin vain hetkittäisiä. Mikäli lajin omat leviämiskeinot eivät riitä, tulee ihminen apuun. Tähän kuitenkin kaivattaisiin lisätutkimusta lajin leviämiskeinoista.

Muutokset eivät ole lehtopalsamille pelkästään positiivisia. Maankäytönmuutokset pääosin haittaavat lajin elämää, kuten Toppilan populaation tila muutama vuosi aineiston keruun jälkeen osoittaa. Ihmisen levittämät lehtopalsamit voivat sotkea paikallisten populaatioiden sopeutumia ja vaarantaa lajin suojelustatuksen pohjoisessa Suomessa. Ihminen levittää lehtopalsamin lisäksi paljon muitakin lajeja. Jättipalsamin on jo monenlaisilla habitaateilla havaittu kilpailevan lehtopalsamin kanssa, vaikeivat lajien ekolokerot ja optimikasvuolosuhteet olekaan aivan päällekkäisiä (Čuda ym., 2014). Toisaalta ihminen saattaa varjelemillaan habitaateilla vähentää häiriöiden syntyä, mikä vaikeuttaa lehtopalsamien elämää. Ilmaston lämpeneminen aiheuttaa lajille ongelmia todennäköisesti sen levinneisyysalueen eteläisellä reunalla. Liian lämpimät talvet voivat estää siementen keväistymisen ja onnistuneen itämisen. Pohjoisella reunalla lämpötilan nouseminen saattaa olla sille jopa hyödyksi. Epävakaiden sääolosuhteiden yleistymien taas voi olla lajille tuhoisaa, etenkin liiallinen tai liian vähäinen kosteus. Tutkittujen Pohjois-Pohjanmaalaisten populaatioiden efektiiviset populaatiokoot olivat pieniä, mikä rajoittaa niiden evoluutiopotentiaalia.

5 Yhteenveto

Tässä tutkimuksessa käytettiin 10 jättipalsamille kehitettyä mikrosatelliittilokusta lehtopalsamipopulaation välisten suhteiden tarkasteluun niin geneettisen muuntelun kuin populaatiorakenteenkin osalta. Populaatioiden käymiä pullonkauloja testattiin ja niiden välistä geenivirtaa arvioitiin. Tutkimukseen otettiin mukaan 8 populaatiota Oulusta, kolme lähdealueilta Utajärveltä ja Pudasjärveltä (reunapopulaatiot) ja yksi verrokiksi Etelä-Suomesta Harjavallasta (keskuspopulaatio). Populaatioiden historiaa selvitettiin kasvitieteellisen puutarhan kokoelmista, laji.fi -tietokannasta ja pitkään alueella kasvien parissa työskennelleiltä. Analyysien tuloksia ja populaatioiden tietoja verrattiin keskenään.

Käytetyt alukkeet toimivat lehtopalsamille vaihtelevalla menestyksellä. Joidenkin lokusten kohdalla tiedoista puuttuu puolet. Aineiston mukaan populaatiot olivat kaiken kaikkiaan melko samankaltaisia muutamaa poikkeusta lukuun ottamatta. Geenivirta kaukaisienkin populaatioiden välillä oli ääretöntä ja suurin osa kohdennustestin kohdentamista yksilöistä ei kuulunut nykyiseen populaatioonsa, tässä syynä populaatioiden ja yksilöiden erotteluun riittämätön tieto. Yksilöt ryhmittyivät kahteen ryhmään, joita oli jokaisessa populaatiossa vaihtelevin suhtein, paitsi Kasvipuutarhan populaatiossa, jonka yksilöitä kuvasi pääosin vain toinen ryhmistä. F_{ST} -arvoin eroavia populaatioita olivat Kasvipuutarhan, Pohjantien ja Karjasillan populaatiot. Populaatiot olivat kohtalaisen muuntelevia odotetun heterotsygotian ja alleelirikkauden perusteella, mutta F_{IS} -arvot olivat korkeita. Vanhoista pullonkauloista löytyi viitteitä jokaisesta populaatiosta, uudemmissa vain Harjavallasta ja Pohjantieltä. Etäisyysisolaatiota ei havaittu.

Keski- ja reunapopulaatioille tyypillisiä piirteitä löytyi, mutta populaatioiden ominaisuuksiin vaikuttivat monet muutkin tekijät. Keskuspopulaatiota edustava Harjavalta oli tutkimuspopulaatioista muuntelevin ja sillä oli suurin efektiivinen populaatiokoko verrattuna varsinaiseen populaatiokokoon. Reunapopulaatioiden reunapopulaatioita edustavat Hämy- ja Hanganhete olivat toisistaan reunapopulaatioille tyypillisesti erilaistuneita. Sukusiittoisuus oli korkeinta Pohjantiellä, Harjavallassa ja Hanganhetteellä. Tämäkin sopii reuna- keskuspopulaatioiden piirteisiin, sillä Harjavallassa oli korkea sukusiittoisuus kenties naapuripölytteisyyden, Hanganhetteellä umpipölytteisyyden ja Pohjantiellä pienen populaatiokoon ja umpipölytteisyyden takia. Kaikilla populaatioilla ilmeni vanhoja pullonkauloja ja kahdella oli merkkejä uudemmissa. Tämä johtuu osin perustajavaikutuksista ja osin populaatioiden muuntelevista populaatiokoista. Jatkuvat pullonkaulat ovat estäneet etäisyysisolaation ilmenemisen. Samasta syystä tunnetusti toisistaan polveutuvat populaatiot eivät ole keskenään keskivertoa samanlaisempia, kun sattuma on ohjannut niitä eri suuntiin. Kasvipuutarhan populaation odotettiin olevan mahdollinen lähdepopulaatio muille

Oulun kaupungin populaatioille, mutta näin ei näyttäisi tämän aineiston valossa olevan. Kasvipuutarhan populaatio erottui monella tapaa muista populaatioista.

6 Kiitokset

Haluan suuresti kiittää ohjaajiani Laura Kvistiä ja Annamari Markkolaa tämän työn ohjaamisesta. Laura Kvistille erityiskiitos kärsivällisyydestä, jota tarvitaan genetiikan ja laboratoriomenetelmien opettamisesta ekologille. Annamari Markkolalle erityiskiitos maastopäivistä ja ideasta tämän työn taustalla. Eläkööt pihansa palsamit kauan! Suuret kiitokset kuuluvat ehdottomasti myös Olli Koskiselle, joka teki suuren työn kartoittaen Oulun lehtopalsameita.

Kiitokset myös Oulun kasvitieteelliselle puutarhalle ja museolle. Etenkin Annu Ruotsalaiselle avusta työn alkuvaiheissa ja aineiston keräämisessä, Tauno Ulviselle kommentaista ja tiedoista lehtopalsamin historiasta Pohjois-Pohjanmaalla, Tuula Kankaalle Kasvipuutarhan palsamien tiedoista, Saara Salmelalle kuvista ja Annikki Kestilälle.

Suurkiitos Laura Törmälälle, joka oli korvaamaton apu laboratoriossa. Hilde Hensille kiitokset PCR:n optimoinnista. Kiitos myös kaikille pikkuapureille: Anniina Lehmukselle, Marjut Pokelalle, Sonja Pikkupeuralle, Rasmus Hindströmille ja Sameli Piirrolle. Erityiskiitos bt-tukihenkilölleni Sami Saarenpäälle. Suuren suuret kiitokset Iida Höyhtyälle kaikesta vertaistuesta ja avusta.

Viimeisenä iso kiitos Suomen Biologian Seura Vanamolle ja Kuopion Luonnon Ystävien Yhdistykselle apurahoista tämän työn toteuttamiseen.

7 Viitteet

- Austad, I., & Skogen, A. (1990). Restoration of a deciduous woodland in western Norway formerly used for fodder production - effects on tree canopy and field layer. *Vegetatio*, 88(1), 1–20.
- Beebee, T. J. C., & Rowe, G. (2008). *An Introduction to Molecular Ecology*. Oxford University Press.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Catch, F. (2004). GENETIX 4.0.5.2., Software under Windows™ for the genetics of the populations. Laboratory genome, populations, interactions, CNRS UMR 5000. University of Montpellier II, Montpellier, France.
- Channell, R. O. B. (2004). The Conservation Value of Peripheral Populations: the Supporting Science. *Proceedings of the Species At Risk 2004 Pathways to Recovery Conference*, 1–17.
- Crawford, R. M. M. (2008). *Plants at the Margin: Ecological Limits and Climate Change*. Cambridge University Press.
- Čuda, J., Skálová, H., Janovský, Z., & Pyšek, P. (2014). Habitat requirements, short-term population dynamics and coexistence of native and invasive *Impatiens* species: A field study. *Biological Invasions*, 16(1), 177–190. <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0512-1>
- Do, C., Waples, R. S., Peel, D., MacBeth, G. M., Tillett, B. J. & Ovenden, J. R. (2014). NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (Ne) from genetic data. *Molecular Ecology Resources* 14(1), 209–214. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12157>
- Eckert, C. G., Samis, K. E., & Loughheed, S. C. (2008). Genetic variation across species' geographical ranges: The central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, 17(5), 1170–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x>
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2017). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, 1, 117693430500100. <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>
- Falinska, K. (1979). Modifications of plant populations in forest ecosystems and their ecotones. *Polish ecological studies*.
- FCG Suunnittelu ja tekniikka, O., Pöyry Finland, O., & Ramboll Finland, O. (2017). *Viinivaaran*

- Frankham, R., Briscoe, D. A., & Ballou, J. D. (2004). *Introduction to conservation genetics*. Cambridge university press.
- Garza, J. C., & Williamson, E. G. (2001). Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10, 305–318.
- Gichner, T., Patková, Z., Száková, J., & Demnerová, K. (2006). Toxicity and DNA damage in tobacco and potato plants growing on soil polluted with heavy metals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 65(3), 420–426. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2005.08.006>
- Goudet, J. (2001). FSTAT, a Program to Estimate an Test Gene Diversities and Fixation indices (version 2.9.3).
- Hämet-Ahti, L., Suominen, J., Ulvinen, T., & Uotila, P. (1998). *Retkeilykasvio*.
- Hamilton, M. (2011). *Population Genetics*. John Wiley & Sons.
- Hatcher, P. E. (2003). *Impatiens noli-tangere* L. *Journal of Ecology*, 91(1), 147–167. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.2003.00741.x>
- Hatcher, P. E., Wilkinson, M. J., Albani, M. C., & Hebburn, C. A. (2004). Conserving marginal populations of the food plant (*Impatiens noli-tangere*) of an endangered moth (*Eustroma reticulatum*) in a changing climate. *Biological Conservation*, 116(3), 305–317. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00200-3](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00200-3)
- Hedrick, P. (2011). *Genetics of Populations*. Jones & Bartlett Learning.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359(1442), 183–195. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1388>
- Hiratsuka, A., & Inoue, O. (1988). Dispersability of dimorphic seeds in *Impatiens noli-tangere* and *I. textori* (Balsaminaceae). *Ecological Review= Seitaiigaku Kenyaku*, 3(157).
- Höyhtyä, I. (2019). *Jättipalsamin populaatiogenetiikka Oulussa*. Oulun yliopisto.
- Kupcinskiene, E., Zybartaitė, L., & Paulauskas, A. (2015). Comparison of genetic diversity of three *Impatiens* species from Central Europe and Baltic region. *Trijų sprigės (Impatiens) rūšių populiacijų genetinė įvairovė Centrinėje Europoje ir Baltijos regione. Žemdirbyste-Agriculture*, 102(1), 87–94. <https://doi.org/10.13080/z-a.2015.102.011>

- Lehtopalsami, Impatiens noli-tangere - Kukkakasvit - LuontoPortti. (2019). Noudettu 26. helmikuuta 2019, osoitteesta <http://www.luontoportti.com/suomi/fi/kukkakasvit/lehtopalsami>
- Lesica, P., & Allendorf, F. W. (1995). When are peripheral populations valuable for conservation? *Conserva*, 9(4), 753–760.
- Luikart, G., Allendorf, F. W., Cornuet, J. M., & Sherwin, W. B. (1998). Phylogenetic Tools for Comparative Biology Error in the estimation of species means and model selection in comparative biology, 238–247. <https://doi.org/10.1093/jhered/89.3.238>
- Luonnonsuojeluasetus 160/1997. Annettu Helsingissä 14.2.1997. Liite 3 C 471/2013. Annettu Helsingissä 19.6.2013
- Markov, M. V. (1991). Population biology of touch-me-not *Impatiens noli-tangere* L. *Soviet Journal of Ecology*, 22(1), 12–20.
- Marton, A. (2011). *Population genetics of the invasive plant species Impatiens glandulifera in Southern Finland*. University of Helsinki.
- Masuda, M., Yahara, T., & Maki, M. (2004). Evolution of floral dimorphism in a cleistogamous annual, *Impatiens noli-tangere* L. occurring under different environmental conditions. *Ecological Research*, 19(6), 571–580. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1703.2004.00673.x>
- McMinn, R. L., Russell, F. L., & Beck, J. B. (2017). Demographic structure and genetic variability throughout the distribution of Platte thistle (*Cirsium canescens* Asteraceae). *Journal of Biogeography*, 44(2), 375–385. <https://doi.org/10.1111/jbi.12879>
- Nordström, S., & Hedrén, M. (2008). Genetic differentiation and postglacial migration of the *Dactylorhiza majalis* ssp. *traunsteineri/laponica* complex into Fennoscandia. *Plant Systematics and Evolution*, 276(1–2), 73–87. <https://doi.org/10.1007/s00606-008-0084-1>
- Pironon, S., Papuga, G., Villellas, J., Angert, A. L., García, M. B., & Thompson, J. D. (2017). Geographic variation in genetic and demographic performance: new insights from an old biogeographical paradigm. *Biological Reviews*, 92(4), 1877–1909. <https://doi.org/10.1111/brv.12313>
- Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J. M., Paetkau, D., Baudouin, L., & Estoup, A. (2004). GENECLASS2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, 95(6), 536–539. <https://doi.org/10.1093/jhered/esh074>
- Piry, S., Luikart, G., & Cornuet, J. M. (1999). BOTTLENECK: A Computer Program for Detecting Recent Reductions in the Effective Population Size Using Allele Frequency Data. *Journal of Heredity*, 90,

502–503. <https://doi.org/10.1093/jhered/90.4.502>

- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Provan, J., Love, H. M., & Maggs, C. A. (2007). Development of microsatellites for the invasive riparian plant *Impatiens glandulifera* (Himalayan balsam) using intersimple sequence repeat cloning: Primer note. *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 451–453. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01614.x>
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity*, 86, 248–249.
- Rousset, F. (2008). Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, (8), 103–106.
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & John, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Segelbacher, G., Cushman, S. A., Epperson, B. K., Fortin, M. J., Francois, O., Hardy, O. J., ... Manel, S. (2010). Applications of landscape genetics in conservation biology: Concepts and challenges. *Conservation Genetics*, 11(2), 375–385. <https://doi.org/10.1007/s10592-009-0044-5>
- Silvertown, J., & Charlesworth, D. (2001). *Plant Population Biology*. John Wiley & Sons.
- Skálová, H., Moravcová, L., & Pyšek, P. (2011). Germination dynamics and seedling frost resistance of invasive and native *Impatiens* species reflect local climatic conditions. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 13(3), 173–180. <https://doi.org/10.1016/j.ppees.2011.03.005>
- Slatkin, M. (1995). A measure of population Subdivision Based on Microsatellite Allele Frequencie. *Genetics*, 462(1), 457–462. <https://doi.org/Article>
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Väre, H., Ulvinen, T., Vilpa, E., & Kalleinen, L. (2005). *Oulun kasvit - piimäperältä pilpasuolle*. Norrlinia 11.
- Walker, N. F., Hulme, P. E., & Hoelzel, A. R. (2009). Population genetics of an invasive riparian

species, *Impatiens glandulifera*. *Plant Ecology*, 203(2), 243–252.
<https://doi.org/10.1007/s11258-008-9540-9>

Waples, R. S., & Do, C. (2010). Linkage disequilibrium estimates of contemporary N_e using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary Applications*, 3(3), 244–262.

Williamson-Natesan, E. G. (2005). Comparison of methods for detecting bottlenecks from microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 6(4), 551–562. <https://doi.org/10.1007/s10592-005-9009-5>